Aus der Chirurgischen Klinik
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-E. Hoffmeister

EXTRAKTION UND BIOLOGISCHE TESTUNG OSTEOPOETISCHER BESTANDTEILE DER KNOCHENMATRIX

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sibylle Emhart, geb. Beck
aus Mengen

1987

UNIV. LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0071

Aus der Chirurgischen Klinik
der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-E. Hoffmeister

EXTRAKTION UND BIOLOGISCHE TESTUNG OSTEOPOETISCHER BESTANDTEILE DER KNOCHENMATRIX

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sibylle Emhart, geb. Beck
aus Mengen

1987

Dekan:	Prof. Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. K.-H. Schmidt
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. A. Wentzensen

Druck:
HUND GMBH
Eckstraße 17, 7968 Saulgau
Telefon 0 75 81 / 76 92

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abkürzungen 4

II. Begriffe 5

1. Einleitung 8

2. Literaturübersicht 11

2.1 Ursprung der Knochenzellen 11

2.2 Ablauf der Osteogenese 16
2.2.1 Endesmale Osteogenese 16
2.2.2 Enchondrale Osteogenese 17
2.2.3 Metaplasie 19

2.3 Indikatoren der Knocheninduktion 19

2.4 Systeme der Knocheninduktion 21
2.4.1 Epithelgewebe 21
2.4.2 Knochen- und Dentingewebe 23

2.5 Parameter, die den Induktionserfolg beeinflussen.. 24
2.5.1 Alter und Art der Versuchstiere 24
2.5.2 Implantationsort 25
2.5.3 Partikelgröße 25
2.5.4 Immunologische Faktoren 26
2.5.5 Sauerstoffkonzentration 26
2.5.6 Physikalische Einflüsse 27
2.5.7 Lokale und systemische Regelmechanismen..... 28

2.6 BMP und BMPase 32
2.6.1 Charakterisierung von BMP 32
2.6.2 Charakterisierung der BMPase 34

2.7 Bestandteile des Knochens 35

3. Problemstellung 36

4. Material und Methoden 37

4.1 Material 37

4.1.1 Tiermaterial 37

4.1.2 Geräte 37

4.1.3 Chemikalien und Medikamente 37

4.1.4 Sonstiges 38

4.2 Methoden 40

4.2.1 Herstellung des Ausgangsmaterials 40

4.2.2 TFA-Extraktion..... 42

4.2.3 Extraktion mit 4M GuHCl-Lösung und Cäsium-Chlorid-Dichte-Gradienten-Zentrifugation 48

4.2.3.1 Guanidiniumchloridextraktion 48

4.2.3.2 CsCl-Dichte Gradienten-Zentrifugation 50

4.2.3.2.1 Dissoziativer Gradient 51

4.2.3.2.2 Assoziativer Gradient 51

4.2.4 Implantationstechnik 53

4.2.5 Implantatserien..... 54

4.2.5.1 Serie 1 54

4.2.5.2 Serie 2 56

4.2.5.3 Serie 3 57

4.2.5.4 Serie 4 57

4.2.5.5 Kontrollversuche 59

4.2.6 Explantate 59

4.2.6.1 Gewinnung der Explantate 59

4.2.6.2 Histologie 60

4.2.6.2.1 Fixieren und Einbetten 60

4.2.6.2.2 Herstellung von Dünnschnitten 60

4.2.6.2.3 Ausbettung 61

4.2.6.2.4 Färbeverfahren 61

4.2.6.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase..... 63

5. Ergebnisse 66

5.1 Rückstand an TFA in Sediment und Überstand 66

5.2 Ergebnisse der Serie 1 67

5.3 Ergebnisse der Serie 2 72

5.3.1 Bestimmung der alkalischen Phosphatase 72

5.3.2 Histologische Ergebnisse 72

5.4 Ergebnisse der Serie 3..... 76

5.5 Ergebnisse der Serie 4..... 77

6. Diskussion 79

7. Zusammenfassung 86

8. Literaturverzeichnis 87

I. Abkürzungen

Abb.	:	Abbildung
AP	:	alkalische Phosphatase
BCF	:	bone chemotactic factor
BDCHF	:	bone derived chemotactic factor
BDGF	:	bone derived growth factor
BMG	:	bone morphogenetic gelatine Knochengelatine
BMP	:	bone morphogenetic protein
DMG	:	Dentin Matrix Gelatine
DOPC	:	determined osteogenic precursor cells
EZR	:	Extrazellulärraum
GuHCl	:	Guanidiniumchlorid
IOPC	:	inducible osteogenic precursor cells
OCG	:	osteogenin containing gelatine
p.a.	:	pro analysi
PTH	:	Parathormon
rpm	:	rotation pro minute
s	:	Standardabweichung
Tab.	:	Tabelle
U	:	Unit
UpM	:	Umdrehung pro Minute
$\bar{x}$	:	Mittelwert

II. Begriffe

allogen: von einem anderen Individuum derselben Spezies stammend (früher : homolog)

autogen: vom selben Individuum stammend (früher: autolog)

BMP: Bone morphogenetic gelatine entsteht bei der Einwirkung von 8 molarem Lithiumchlorid auf die mit 0,6 normaler Salzsäure entkalkte Knochenmatrix (Urist et al., 1973).

BMP: Die osteogenetische Komponente der Matrix von Knochen, Dentin und anderen Geweben, die man durch Demineralisation isolieren kann und eng mit kollagenen Fibrillen verbunden ist, wird "bone morphogenetic protein" genannt (Urist and Strates, 1971). Dieser Begriff wird synonym für Osteogenin verwendet.

Dialyse: selektive Diffusion gelöster Teilchen durch eine semipermeable Membran (Real-Lexikon der Medizin, Urban und Schwarzenberg Verlag München-Berlin-Wien, 1966).

Differenzierung: Umwandlung von allgemeinen polyvalenten Strukturen (Zellen, Gewebe, Baupläne, Verhaltensmuster) und potentiellen Funktionen in spezialisiertere (Real-Lexikon, s.o.).

Inducer, Induktor: Als Inducer werden diffusible, als Induktor nichtdiffusible chemische Substanzen verschiedenster Art bezeichnet, welche die Zell- bzw. Gewebsdifferenzierung omnipotenter Zellen oder Gewebe stimulieren (Urist and Strates, 1971).

Induktion: embryonale oder morphogenetische Auslösung eines Wachstums- oder Differenzierungsvorganges an einer bestimmten Zelle oder Zellgruppe durch Einwirkung einer bestimmten anderen Zelle oder Zellgruppe oder durch einen exogenen abiotischen, nach Art eines Reizes wirkenden Einfluß (Real-Lexikon, s.o.)

Implantation: temporäres, evtl. relativ kurzfristiges Einbringen eines Implantates in einen Körper (Real-Lexikon, s.o.)

Metaplasie: Übergang eines reifen Gewebes in ein anderes ebenfalls differenziertes Gewebe

mononukleäres phagozytierendes System: Makrophagen, Monozyten und deren Vorläuferzellen werden unter diesem Begriff zusammengefaßt, da sie einen gemeinsamen Ursprung haben (van Furth et al., 1972).

Osteogenese: Bildung bzw. Entwicklung von Knochengewebe (Real-Lexikon, s.o.)

Osteogenin: eine oder mehrere Sustanzen, die die Knochen bildung steuern (Lacroix, 1945)

Osteoinduktion: zu Osteoblasten führende Induktion

paraossales Blastem: Als paraossales Blastem wird der Raum zwischen Muskulatur, periossalem Blastem und den Fragmentenden mit dem toten Knochengewebe bezeichnet.

Transformation: grundlegende Veränderung der sichtbaren und chemischen Eigenschaften von Fibroblasten auf bestimmte Reize hin, z.B. bei der Implan-

tation von Knochenmatrix (Huggins et al., 1970)

Transplantat: durch Transplantation in den Organismus eingepflanzte Zellen, Gewebe oder Organe (Real-Lexikon, s.o.).

Transplantation: Einpflanzung lebender Zellen, Gewebe oder Organe an eine andere Stelle des gleichen Organismus oder in einen anderen

xenogen: von einem Individuum einer anderen Spezies stammend (früher: heterolog).

1. Einleitung

Schon früh machten sich Wissenschaftler und Kliniker Gedanken über die Knochenbildung und Frakturheilung.
Gegen Ende des letzten Jahrhunderts war man der Meinung, daß die Neubildung und Entwicklung des Knochens durch kompetente knochengewebsspezifische Zellen sowohl des Transplantates als auch des Empfängerlagers verursacht werden. Osteozyten und Osteoblasten des Lagers wurden zusammen mit den überlebenden Osteoblasten der Kambiumschicht des Periostes und den Zellen aus dem Knochenmark als Träger der Knochenneubildung angesehen.
Diese Vorstellung wurde 1938 von Levander als spezifische Osteoblastentheorie bezeichnet.
Mit den damals zur Verfügung stehenden Methoden war eine exakte Unterscheidung zwischen den Zellen des Transplantates und denen des Empfängers nicht möglich.

Gegen die spezifische Osteoblastenlehre sprachen die bereits vorhandenen Versuchsergebnisse von Senn (1889). Durch die Implantation von entkalktem mit Sublimat-Alkohol sterilisiertem Knochen heilte er Trepanationsdefekte bei Hunden, die nach Ausräumung osteomyelitischer Herde entstanden waren.

Die o.g. Bedeutung des Periostes wurde von Baschkirzew und Petrow 1912 durch die metaplastische Theorie der Knochenbildung in Frage gestellt. Sie nahmen an, daß die Osteogenese nach freier Knochentransplantation nicht das Werk spezifischer überpflanzter Zellen ist, sondern daß der neugebildete Knochen ein metaplastisches Umwandlungsprodukt des unspezifischen Lagerbindegewebes darstellt. Nach ihrer Theorie vermittelt die Knochenhaut lediglich eine schnellere vaskuläre Verbindung mit der Umgebung. Die noch undifferenzierten pluripotenten jungen Mesenchymzellen sollen durch die Anwesenheit abgestorbener Knochensubstanz zur Weiterentwicklung in osteogenetisches Gewebe

veranlaßt werden (Martin, 1927; Levander, 1938).

Lerich und Policard (1926) vertraten in diesem Zusammenhang die Vorstellung, daß die Knochenbildung überhaupt ein humoraler von zellulärer Aktivität unabhängiger Vorgang ist. Als beweisend wurde die Beobachtung angesehen, daß auch nach Transplantation frischer mark- und periostloser Kortikalisstückchen Knochen entstand (Baschkirzew and Petrow, 1912; Wjereschinski, 1925).

Levander (1938) ging davon aus, daß die knocheninduzierende Substanz aus dem Transplantat freigesetzt und mit der Lymphe in die Umgebung gespült wird. Deshalb stellte er Alkoholextrakte von Knochen und Kallus her und injizierte diese in die Weichteile von Kaninchen. In 22% der Fälle konnte er eine unterschiedlich starke Knorpel- und Knochenbildung feststellen. Die Injektion von Alkohol oder von Alkoholextrakten anderer Gewebe verlief negativ. Orell (1934) wiederholte die o.g. Versuche von Levander an weißen Mäusen, Meerschweinchen und am Menschen ohne positiven Befund.

Heinen, Dabbs und Mason (1949) stellten entgegen der Versuchsergebnisse von Levander fest, daß die unspezifische Reizung von Alkohol bei Kaninchen zu Knochenbildung führen kann.

Um zu beweisen, daß ein Überleben osteogenetischer Zellen des Transplantates für die Knochenneubildung nicht notwendig ist, machte Orell (1934) einige subcutane Einpflanzungen am Menschen mit mehrmals bis auf -190°C abgekühlten Knochenstückchen. Nach längerer Zeit fand er an einem Implantationsort eine beginnende und an einem zweiten eine deutliche Knochenbildung.

1940 berichtete Annersten über erfolgreiche Injektionen von homologen Säure-Alkoholextrakten (95 Teile absoluter Alkohol und 5 Teile 0,2%ige HCl) an Kaninchen mit einem positiven Befund bei über 50% der Tiere.

Bertelsen kam 1944 zu dem Schluß, daß die verschiedenen Teile des Knochens (Mark, Epiphyse und Periost) unterschiedliche osteogenetische Wirksamkeit aufweisen. Mit dem Extrakt aus dem Mark erzielte er die besten Ergebnisse.

Lacroix (1945) stellte sich vor, daß die Neubildung von Knochen durch eine spezifische osteogenetische Substanz gesteuert wird, die er Osteogenin nannte.

Urist wies als erster eine die Knochenneubildung auslösende Wirkung der Knochengrundsubstanz nach. Er bezeichnete diese biologische Wirkung der Knochenmatrix, die undifferenzierte mesenchymale Zellen veranlaßt, sich zu Osteoblasten zu differenzieren, als Osteoinduktion.

Bis heute arbeiten mehrere Gruppen von Wissenschaftlern und Klinikern daran, die Struktur und die Wirkungsweise des Osteogenins aufzudecken. Dies ist bis heute jedoch nur teilweise gelungen.

2. Literaturübersicht

2.1 Ursprung der Knochenzelle

Binde- und Stützgewebe leiten sich im Laufe der Embryonalentwicklung vom Mesenchym ab.
Mesenchymale Zellen sind in der Lage sich in Bindegewebszellen (retikuläres Bindegewebe und fasriges Bindegewebe), Muskelzellen, Knorpel- und Knochenzellen zu differenzieren. Je nach Spezies scheint eine Interaktion der ektomesenchymalen Zellen aus der Neuralleiste mit Zellen des Ektoderms oder Entoderms notwendig zu sein (Hall, 1980).

Im postfetalen Leben entwickeln sich die Osteoblasten aus fixierten Bindegewebszellen des Stromas (Owen, 1980).
Die unmittelbare Vorläuferzelle, der Präosteoblast, liegt nahe bei einem Osteoblasten und besitzt die Fähigkeit zur Proliferation (Owen, 1971). Da diese Zellen reichlich alkalische Phosphatase enthalten und auch andere Charakteristiken eines Osteoblasten aufweisen, handelt es sich bereits um gut ausdifferenzierte Zellen (Pritchard, 1956 und 1976).

Friedenstein und seine Arbeitskollegen demonstrierten das osteogenetische Potential der Stromazellen des Knochenmarks anhand einer von ihnen entwickelten Methode.
Sie stellten Suspensionen einzelner Zellen, die vom ganzen Gewebe des Knochenmarks stammten, her und züchteten diese Zellen zu einlagigen Fibroblastenkulturen. Nach Implantation von Markzellen oder der in vitro gezüchteten Fibroblasten bildete sich innerhalb einiger Wochen ein lebensfähiges verkalktes Gewebe (Friedenstein et al., 1970; Friedenstein, 1973). Owen erhielt dieselben Ergebnisse und schloß daraus, daß postnatales Knochenmark undifferenzierte mesenchymale Zellen enthält, und daß diese Zellen Bestandteile des stromalen Zellsystems und frühe Vorläuferzellen der Chondro- und Osteozyten sind (Owen, 1980). Friedenstein gab diesen Zellen den Namen "determined

osteogenic precursor cells" (DOPC) (Friedenstein, 1973). Sie sind nur im Periost, im Stroma des Knochenmarks und im Stromagewebe der Spongiosa zu finden, wo die Osteoblasten durch die Modulation und Proliferation bereits determinierter Zellen entstehen (Vitalli, 1970).

Fibroblasten, die Friedenstein aus Thymusstroma, Milz-, Lymphknotenstroma, aus peripherem Blut und peritonealer Flüssigkeit kultivierte, bildeten im Gegensatz zum Stroma des Knochenmarks nur dann Knochen, wenn ein induzierendes Agens z.B. Übergangsepithel mitimplantiert wurde (Friedenstein, 1968). Diese Zellen, die zur Osteogenese induziert werden können, gibt es in vielen Geweben des Körpers und wurden von Friedenstein "inducible osteogenic precursor cells" (IOPC) genannt (Friedenstein, 1976).

1962 faßte Young die in der Literatur genannten mesenchymalen Vorläuferzellen wie Retikulum- und Spindelzellen sowie Fibroblasten unter dem Begriff "osteoprogenitor cells" zusammen.

Vor nicht allzu langer Zeit dachte man noch, daß Osteoblasten und Osteoklasten von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen, die sich je nach lokalem Stimulus zu einer der beiden Zellen entwickelt (Owen, 1970).

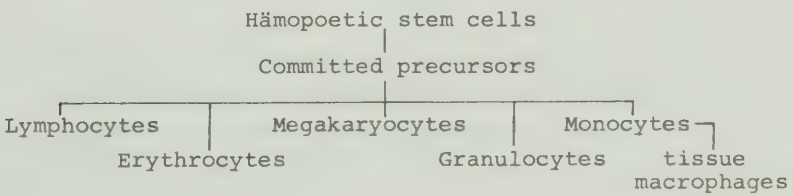
Buhring vertrat 1975 die Ansicht, daß Wanderhistiozyten, Makrophagen, Matrixklasten und Osteoklasten aus sogenannten "blood-borne monocytoid cells" entstehen, während sich perivaskuläre Bindegewebszellen zu Osteoblasten und Osteozyten differenzieren. Einen wichtigen Beweis dafür, daß sich der Osteoklast von einer hämatopoetischen Stammzelle ableitet, erbrachte Ash (1980) in folgendem Versuch mit beigen Mäusen : Beige Mäuse haben in granulierten Leukozyten, in Monozyten und in Osteoklasten, aber nicht in Fibroblasten und Osteoblasten sehr große Lysosomen. Knochenmark von diesen Mäusen, das tödlich bestrahlten Mäusen mit Mikrophthalmus infundiert wurde, erzeugte in den bestrahlten Tieren Osteoklasten mit gleichviel und

ebenso großen Lysosomen wie in der Kontrollgruppe. Die charakteristischen Lysosomen wurden in den Lymphozyten nicht gefunden. Aufgrund dieses Experimentes kommen Granulozyten und auch Monozyten als mögliche osteoklastische Vorläuferzellen in Frage.

Die Morphologie und die Fähigkeit zur Phagozytose legen die Zugehörigkeit der Osteoklasten zum mononukleären, phagozytierenden System nahe (Owen, 1980).
Die Bildung von Osteoklasten durch Fusion von Monozyten oder Makrophagen ist bisher noch nicht direkt beobachtet worden. Auch konnten immunologisch wirksame Rezeptoren, die sich auf der Zellmembran von Monozyten und Makrophagen befinden, auf Osteoklasten nicht nachgewiesen werden (Shapiro et al., 1979).

Burger et al. (1982) kultivierten Knochen von Mäuseembryonen mit mononukleären Phagozyten aus dem Knochenmark, mit Periost und mit Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen. Das Periost der Mäuseknochen wurde vorher entfernt.
Sie erhielten folgende Ergebnisse :
Bei der Kultivierung von periostlosem Knochen mit mononukleären Phagozyten des Knochenmarks sowie mit dem dazugehörigen Mesenchym entwickelten sich histologisch nicht differenzierbare Osteoklasten. Keine Osteoklasten entstanden in den Kulturen mit Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen. Burger und seine Arbeitskollegen sehen dies als Beweis dafür an, daß der sich vermehrende unreife mononukleäre Phagozyt die Zelle ist, die nach Induktion zu einem Osteoklasten werden kann.

Cline (1975) lieferte folgendes Schema über die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen :



Die hämatopoetischen Stammzellen bringen einige proliferierende Vorläuferzellen hervor, von denen jede eine eigene Zellinie festlegt. Die Linie, zu der der Osteoklast gehört, kann noch nicht endgültig bestimmt werden (Owen, 1980). Am wahrscheinlichsten erscheint die der mononukleären Phagozyten.

Willmer stellte 1970 ein noch heute gültiges Schema über die Herkunft von Knochen-, Binde-, Muskelgewebe und hämatopoetischen Zellen auf (siehe Abb. 1).
Gleich zu Anfang unterteilen sich die zygotischen Blastomeren in Amöboblasten (Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems und der Osteoklasten) und in Mechanoblasten (Vorläuferzellen des Knochen-, Binde- und Muskelgewebes).
Die Identifikation dieser zwei Zellklassen und einer dritten, die der Epitheliozyten, basiert auf in vitro Eigenschaften der Zellen, besonders von heranwachsenden Zellen aus Explantat- oder Organkulturen. Sie unterscheiden sich in ihrer Morphologie, Physiologie und metabolischen Erfordernissen. Aus der Serie der Mechanozyten gehen die Myxoblasten und die Myoblasten hervor.
Die Myxoblasten entwickeln sich weiter zu Skleroblasten, Fibroblasten und Retikulozyten. Aus den Myoblasten entstehen sowohl die Muskelzellen des Herzens als auch die quergestreifte und glatte Muskulatur.
Nach jedem Schritt der Differenzierung sind die Möglichkeiten der Weiterentwicklung eingeschränkt. Es liegen allerdings Angaben darüber vor, daß es ein Übergehen von einer Zelle in eine andere desselben Stammzellpools gibt. Unstimulierte Mechanozyten können in vitro sowohl Knochen als auch Knorpel bilden, d.h. Osteoblasten und Chondroblasten sind eine Modulation eines Mechanozyten (Hall, 1978).

Während der Kultivierung bestimmter Gewebe (z.B. Herzmuskel) kommt es zum Wachstum und zur Auswanderung von Fibroblasten, die Willmer Mechanozyten nennt. Die Bezeichnung Fibroblasten will er jenen Zellen vorbehalten,

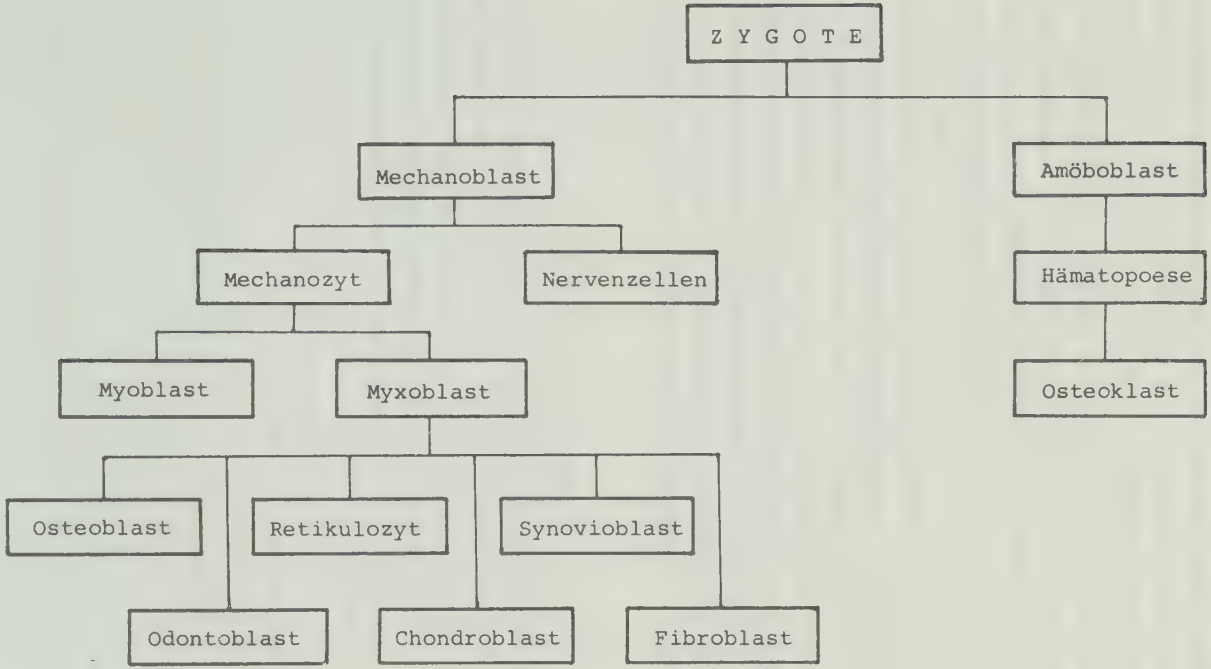


Abb. 1: Willmer-Schema

die Bindegewebsfasern produzieren.
Nach Einstellen des Wachstums beginnen sich die Mechanozyten wieder zu den Zellen zu differenzieren, von deren Kultur sie abstammen.

Der Mechanozyt ist eine definierte und erkennbare Form der Zellerscheinung und kennzeichnet das Verhalten der Zellen, von denen er in vitro abstammt. Unter geeigneten Bedingungen hat er die Möglichkeit zur weiteren Differenzierung.
Aus seinen Versuchen schließt Willmer, daß eine große Gruppe von Geweben des Körpers, wenn sie explantiert werden und in vitro kultiviert, Zellen hervorbringen, die sich wie Mechanozyten verhalten. Dieses Verhalten ist eine Vereinfachung der normalen Zellfunktion, aber nur eine teilweise Dedifferenzierung. Die Fähigkeiten sind wahrscheinlich mehr oder weniger irreversibel und können unter geeigneten Bedingungen wieder auftreten.

2.2 Ablauf der Osteogenese

Die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Knochen kann auf zwei verschiedenen Wegen ablaufen. Während sich bei der endesmalen oder intramembranösen Osteogenese die Knochenzellen direkt aus mesenchymalen Zellen entwickeln, bildet sich bei der enchondralen Ossifikation zuerst Knorpel und dann Knochen.

2.2.1 Endesmale Osteogenese

Endesmale oder intramembranöse Osteogenese findet in der Embryonalentwicklung nach epithelial-mesenchymaler Interaktion statt (Hall, 1980). Ein Beispiel stellt die Differenzierung der Unterkieferknochen der Maus dar. Die aus der Neuralleiste ausgewanderten Zellen differenzieren sich nur zu Osteoblasten, wenn sie vorher mit dem Unterkieferepithel Kontakt hatten.

Eine endesmale Knochenbildung, die während des ganzen Lebens abläuft, ist die periostale Osteogenese. Unter stabilen Bedingungen findet auch im Rahmen der Frakturheilung eine intramembranöse Knochenbildung statt (Schenk und Willenegger, 1964).

Bei der endesmalen Osteogenese sprießen schon nach sehr kurzer Zeit Blutgefäße in den betreffenden Bereich ein. Innerhalb von 1-2 Tagen bildet sich primitiver Faserknochen, der dann durch Lamellenknochen ersetzt wird. Induktion intramembranöser Knochenbildung beobachtete Huggins bereits 1931 nach Verpflanzung von Übergangsepithel in die Muskulatur von Hunden (siehe Kap. 2.4.1). Nach Implantation kollagenfreier Matrixbestandteile konnten Thielemann et al. (1982) ebenfalls eine Induktion der endesmalen Osteogenese erzielen.
Die stoffliche Ursache dieses Vorgangs wurde mit dem Namen "Intramembranous Osteogenesis Inducing Activity" (IOIA) belegt.

2.2.2 Enchondrale Osteogenese

Die enchondrale Osteogenese stellt folgende biologische Kaskade dar :

- Chemotaxis von Vorläuferzellen
- Proliferation von Mesenchymzellen
- Chondrozytendifferenzierung
- Hypertrophie der Chondrozyten
- Kalzifizierung von Knorpelgewebe
- Vaskularisation
- Knorpelresorption
- Osteoblastendifferenzierung
- Bildung der Knochenmatrix
- Mineralisation
- Knochenumbau
- Differenzierung von Knochenmark

(Reddi, 1982)

Sie kommt pränatal bei der Ausbildung von Teilen des Skeletts, postnatal an der Wachstumsfuge und bei der Heilung von nicht vollständig stabilisierten Frakturen vor. Durch Implantation von Knochenmatrix oder -gelatine kann man ebenfalls eine enchondrale Osteogenese induzieren (induzierte enchondrale Osteogenese).

Nach subcutaner Implantation demineralisierter Matrix in allogene Ratten kommt es zur Hämostase. Am 1. Tag stellt das Implantat ein Konglomerat aus Fibringerinnsel, Matrix und polymorphkernigen Leukozyten dar. Am 3. Tag findet man mesenchymale Zellen in der nächsten Umgebung des Implantates. Diese Zellen proliferieren und differenzieren sich am 5. Tag zu Chondroblasten. Im Laufe des 7. und 8. Tages ist reichlich Knorpel vorhanden. Während die Knorpelzellen hypertrophieren und degenerieren, tritt am 9. Tag eine Mineralisation der extrazellulären Matrix auf. Nach der Gefäßeinsprossung kommt es über die Resorption des mineralisierten Knorpelgewebes durch Chondroklasten zu einem knöchernen Ersatz. Der zunächst geflechtartige Knochen wird zu lamellärem Knochen umgebaut. Zugleich differenziert sich Knochenmark (Urist, 1970; Reddi, 1982).

Reddi und Huggins (1972) beobachteten in ihren Versuchen eine geringe entzündliche Reaktion um die Implantate herum. Urist dagegen (1970) beschrieb vielkernige Riesenzellen (Matrixklasten), die wahrscheinlich durch Fusion von fixierten Mesenchymzellen entstanden sind. Diese Matrixklasten sind wesentlich an der Resorption der alten Knochenmatrix beteiligt.
Linden (1975), Putte und Urist (1965) kamen zu dem Ergebnis, daß die teilweise Resorption der Implantate der Osteogenese vorausgeht.

Die Erhaltung der Osteoneogenese ist von einem ständigen Nachschub von Substanzen aus der implantierten Matrix abhängig. Nach kompletter Resorption kommt es zum Abbau des neugebildeten Knorpel- bzw. Knochengewebes.

2.2.3 Metaplasie

Bisher wurde im Rahmen der Frakturheilung und der induzierten Osteogenese in aller Regel von einem Ersatz des hypertrophierten, degenerierenden, mineralisierten Knorpelgewebes nach dem Muster der enchondralen Osteogenese ausgegangen. Inzwischen gibt es aber eine Reihe anderer Versuchsergebnisse, die an dieser These zweifeln lassen. Daß Chondrozyten die Mineralisation der Knorpelmatrix überleben und osteozytenähnliche Funktion und Morphologie annehmen können, konnten 1967 Crelin und Koch aufzeigen. Eine Umdifferenzierung bzw. Modulation zum Osteozyten beschrieb Holtrop (1967) am Rippenknorpel.

Thielemann (1985) konnte durch heterotope Implantation osteoinduktiver Matrix oder Knochengelatine eine Metaplasie der Knorpelzelle zur Knochenzelle beobachten. Die Zellen scheinen keinen stabilen differenzierten Zustand zu erreichen, sondern es scheint ein metaplastischer Übergang von der amöboiden mesenchymalen Zelle bis hin zum Osteozyten abzulaufen.

Ebenfalls konnte Thielemann (1985) im Rahmen seiner Untersuchungen über die sekundäre Frakturheilung eine metaplastische Umwandlung des Knorpelkallus zum chondroiden Knochengewebe verzeichnen. Die Ergebnisse zeigen, daß die heterotop induzierte Knochenbildung der Osteogenese im paraossealen Frakturblastem in allen Vorgängen gleicht.

2.3 Indikatoren der Knocheninduktion

Schon sehr früh kann man an verschiedenen Parametern eine erfolgte Induktion ablesen. Als eines der ersten Zeichen tritt nach Huggins et al. (1970) ein steiler Konzentrationsanstieg der alkalischen Phosphatase mit einem Maximum am 14. Tag auf. Reddi und Huggins (1972) erhielten das Maximum bereits am 10. Tag nach der Operation. Über einen starken Anstieg am 5. Tag nach Implantation und

einem Maximum am 20. Tag berichteten Firschein und Urist (1971 und 1972). Bei allen lag noch Wochen nach Versuchsbeginn die Aktivität der alkalischen Phosphatase deutlich über den Kontrollwerten.

Die alkalische Phosphatase kommt in vielen Geweben vor. Hohe Enzymwerte sind in den Knorpelzellen, in den mineralisierenden Knorpelarealen und in den neugebildeten Knochenbälkchen des Kallusgewebes vorhanden (Dunham et al., 1983). Im Gegensatz zu den Chondroblasten des Gelenkknorpels und der Wachstumsfuge enthalten die induzierten Knorpelzellen nicht erst im hypertrophierten Zustand die AP. Bereits die proliferierenden zunächst noch als Fibroblasten imponierenden Zellen weisen in der osteogenetischen Phase schon deutliche Enzymaktivität auf. Die bereits differenzierten Osteoblasten zeigen nur noch eine schwach positive Enzymreaktion.

In signifikanten Mengen liegt die AP im Zytoplasma und im Kern der induzierten Zellen sowie in der Knochenmatrix vor (Bourne, 1972).

Inhibitionsversuche mit L-Homoarginin und L-Phenylalanin identifizieren das Enzym als knochenspezifische alkalische Phosphatase (Osbody, 1981). Durch L-Homoarginin erfolgt eine Hemmung des Enzyms um ungefähr 70%, durch L-Phenylalanin um ca. 30%.

Die von der alkalischen Phosphatase katalysierten Reaktionen, Phosphorilierung und Dephosphorilierung, gehören zu den wichtigsten Stoffwechselprozessen. Die genaue Funktion bei der Osteogenese ist allerdings noch nicht bekannt.

Ein ebenfalls wichtiger Parameter der Osteoinduktion ist der Kalziumgehalt. Er steigt ab dem 10. Tag deutlich an und erreicht am 30. Tag ein Maximum (Firschein and Urist, 1972). 1970 verwendeten Urist et al. das auf die Implantatmenge bezogene Aschegewicht nach Verbrennung bei 600°C als quantitatives Maß der Knochenneubildung.

Außerdem werden in der Literatur folgende geeignete aber aufwendige Indikatoren der Osteoinduktion beschrieben :

- Einbau von tritiummarkiertem Thymidin (Anderson and Coulter, 1967)
- Anstieg der sauren Phosphatase (Buhring and Semb, 1970)
- Phosphatgehalt (Urist et al., 1970)
- Laktat-Malat-Dehydrogenase Quotient (Reddi and Huggins, 1971)
- Gehalt an DNA gebundenem Phosphor (Firschein and Urist, 1971)
- Sulfatasegehalt (Firschein and Urist, 1972)
- Nachweis von Kollagenneubildung über den Einbau von radioaktivem Prolin (Firschein and Urist, 1972)
- Aufnahme von radioaktivem Schwefel und Phosphor (Reddi and Huggins, 1973)

Der wichtigste Parameter für eine erfolgte Osteoinduktion ist die morphologische Feststellung einer Knochenneubildung und im Falle der induzierten enchondralen Osteogenese der histologische Nachweis von Knorpel als Zwischenstufe.

2.4 Systeme der Knocheninduktion

2.4.1 Epithelgewebe

Schon im Jahr 1917 beobachtete Neuhof, daß sich auf der Oberfläche von Faszientransplantaten, die zur Deckung von Harnblasendefekten bei Hunden benutzt wurden, Knochen bildete. 1931 wiederholte Huggins diese Versuche. Er ersetzte ein Stück der Blasenwand durch die vordere Faszie des Musculus rectus abdominis. Nach 55 Tagen bedeckte Übergangsepithel das Autotransplantat, und in enger Nachbarschaft zum Epithel enthielt es an einigen Stellen Knochen. Ebenfalls positive Ergebnisse erhielt er nach autogener Transplantation von Blasenmukosa auf die Rektusscheide. Dagegen induzierte epithelfreies Blasengewebe

keine Knochenbildung. In weiteren Versuchen wies Huggins die osteogenetische Wirksamkeit des Ureters und des Nierenbeckens nach. Keine Osteoinduktion konnte er nach Transplantation von Epithel aus der Rinde und aus dem Mark der Niere feststellen. Später wurden diese Ergebnisse an Ratten und Meerschweinchen bestätigt (Huggins et al., 1936; Abdin and Friedenstein, 1972; Friedenstein and Lalykina, 1972; Joseliani, 1972).

Zur weiteren Klärung der osteogenetischen Aktivität von Übergangsepithel implantierten Goldhaber 1961 und Friedenstein 1962 dieses mittels Diffusionskammern in Meerschweinchen und Ratten. Außerhalb der Kammer entstand neuer Knochen. Da das Übergangsepithel keinen direkten Kontakt zum umgebenden Bindegewebe hatte, kam Friedenstein zu der Ansicht, daß ein lösliches Produkt des Epithels durch die Kammermembran diffundiert und in der Umgebung osteogenetisch aktiv wird.

Nach der Transplantation von Übergangsepithel z.B. in die Bauchwand kommt es zu einer Dedifferenzierung gewisser Zellen und zur Ausbildung eines zystischen Hohlraumes auf der epithelialen Seite. In den dedifferenzierten Zellen werden elektronenmikroskopisch Vakuolen sichtbar, die in den epithelbegrenzten Hohlraum ausgeschieden werden. Einige Tage nach Implantation kommt es zur Proliferation der bindegewebigen Zellelemente in der Umgebung des Hohlraumes. Diese Zellen bilden schließlich extrazelluläre Matrix, die mineralisiert wird.
Nicht das spezialisierte Übergangsepithel d.h. der nicht mehr proliferierende Teil, sondern das neugebildete Epithel löst die Osteoinduktion aus.

Huggins stellte 1931 fest, daß es zwei Gruppen von Fibrozyten geben muß, die verschieden auf proliferierendes Blasenepithel reagieren, sich aber morphologisch nicht unterscheiden. Nur eine Gruppe beantwortet den osteogenetischen Stimulus eines geeigneten Epithels. Hierzu

gehört z.B. das subcutane Bindegewebe, das Bindegewebe der Muskeln und die Muskelfaszien (siehe Kap. 2.1).

Auch nach Verpflanzung von Gallenblasenepithel bildet sich in enger Nachbarschaft der proliferierenden Zellen Knochen (Huggins and Sammet, 1933).

2.4.2 Knochen- und Dentingewebe

Basierend auf den Forschungsergebnissen von Urist und Mitarbeitern wird allgemein anerkannt, daß Knochen neuen Knochen und Knorpel erzeugt (Urist, 1965; Urist, 1970; Urist and Strates, 1971; Urist et al., 1973; Butler et al., 1977).

Sowohl frischer unbehandelter als auch demineralisierter Knochen löst eine Osteoinduktion aus. Das entkalkte Knochengewebe führt jedoch innerhalb einer kürzeren Zeitspanne zu einer größeren Ausbeute an Knochen (Putte and Urist, 1965; Linden, 1975; Chalmers et al., 1975). Ray und Holloway (1957) führten dies auf eine langsamere Resorption der kalkhaltigen Matrix und auf ungünstigere Bedingungen für das Einwandern von Zellen zurück.

Nicht nur autogenes und allogenes, sondern auch xenogenes Material führt nach der Implantation zu positiven Ergebnissen (Urist et al., 1972; Urist, 1965; Huggins, 1970; Reddi and Huggins, 1971 und 1972).

Die osteogenetische Aktivität der Knochengelatine untersuchten 1973 Urist et al.. Gelatine hat den Vorteil einer raschen Resorption und einer hohen osteoinduktiven Potenz.

Mehrere Autoren berichten auch über Knochenbildung nach Verpflanzung von devitalisiertem Osteosarkom (Heiple et al., 1968; Amitani et al., 1974 und 1975; Urist et al., 1977; Hanamura and Urist, 1978).

Durch Dentin läßt sich ebenfalls eine Osteoinduktion hervorrufen (Linden, 1975; Butler et al., 1977; Inoue, 1981). Register et al.stellten fest, daß lyophilisiertes und

pulverisiertes Dentin phagozytiert wird und somit ineffektiv ist, während dekalzifiziertes Zahnmaterial eine knocheninduzierende Fähigkeit aufweist (Register et al., 1972).
Bang und Mitarbeiter (1972) heilten künstlich geschaffene Defekte im Kiefer von Affen durch Implantation von allogener Dentinmatrix.

1981 ergaben Versuche von Gould et al., daß DMG (Dentin Matrix Gelatine) alle Kriterien eines osteogenetisch wirksamen Transplantatmaterials erfüllt.

2.5 Parameter, die den Induktionserfolg beeinflussen

2.5.1 Alter und Art der Versuchstiere

Urist stellte 1973 fest, daß mit zunehmendem Alter des Empfängers die Knochenbildung geringer ausfiel. Keine Bedeutung maß er dem Alter des Spenders zu.
Andere Forscher erzielten allerdings eine größere Knochenausbeute bei Verwendung von Implantationsmaterial Neugeborener oder noch besser in der Aduleszens befindlicher Spender (Lacroix, 1945 und 1947; Heiple et al., 1968). Fasol und Galle (1973) waren der Ansicht, daß ein ersatzstarkes Lager für die Knochenneubildung bei Transplantationen vorteilhaft sei, was aber nur ein junger Empfänger bieten kann.

Da Kaninchen bereits auf unspezifische Irritationen mit Knochenbildung im Bereich des Hämatoms reagieren können, eignen sie sich als Versuchstiere nur wenig (Blum, 1944; Heinen et al., 1949). Außerdem sind kleinere Nagetiere ihnen in Bezug auf ihre quantitative Induzierbarkeit überlegen (Friedenstein, 1968; Wlodarski et al., 1974). Huggins et al. (1970) fanden bei Ratten - vor Meerschweinchen und Mäusen - die höchsten Knochenerträge.

2.5.2 Implantationsort

Um Einflüsse vom Skelettsystem des Empfängers auszuschließen, wurde bisher möglichst weit entfernt von Knochen, Knorpel, Periost und Gelenken implantiert. Am häufigsten wurde intramuskulär implantiert und injiziert. In der Muskulatur hat das Implantat den nötigen Kontakt mit induktiv kompetenten Zellen (IOPC) und eine ausreichende Kapillarisierung ist möglich, was eine ideale Sauerstoffspannung und einen guten Abtransport von Metaboliten gewährleistet.

Urist (1965), Bang (1972) und Thielemann (1985) bevorzugen die Bauchmuskulatur. Andere Autoren ziehen die Implantation in die Rückenmuskulatur (Chalmers et al., 1975) oder in die Oberschenkelmuskulatur (Anderson and Coulter, 1967) vor. Während Luostarinen und Rönning (1977) nach Implantation ins subcutane Bindegewebe positive Ergebnisse erzielten, konnten Hancox und Wlodarski (1971) an dieser Stelle keine Knochenbildung beobachten. Wichstrom und sein Kollege Mosimann (1951), Ray et al. (1952) und Urist (Urist and MC Lean, 1952) benutzten die vordere Augenkammer als Implantationsort, da dieser den Vorteil bot, Veränderungen am Transplantat mit der Spaltlampe zu verfolgen. Bedingt durch die schlechte Vaskularisation in diesem Bereich, kam man jedoch bald wieder davon ab.

Nach Implantation von osteoinduktivem Material in Leber, Gehirn, Lunge, Milz und Niere konnte keine Osteogenese ausgelöst werden. Diese Tatsache führte Connor (1983) auf einen Mangel an "Inducible osteoprogenitor-cells" (IOPC) in diesen Geweben zurück.

2.5.3 Partikelgröße

Bei der Testung verschieden großer Matrixpartikel stellte sich heraus, daß es eine Mindestteilchengröße gibt. Keine Knocheninduktion erfolgte in Kaninchen nach Implantation

von demineralisierten Knochenpartikeln mit einem Durchmesser von 250 bis 450 µm (Urist et al., 1967). Auch in Ratten zeigten Partikel unter 400 µm Durchmesser keinen oder nur geringen Erfolg (Urist et al., 1977).
Die höchsten Calciumwerte erhielten Urist et al.(1975) nach Implantation von Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 400 und 1000 µm. Sie kamen deshalb zu dem Schluß, daß die Bestandteile der kleinen Teilchen, darunter das BMP, besser löslich sind als die der größeren Partikel und deshalb zu schnell vom Implantationsort wegdiffundieren können.

2.5.4 Immunologische Faktoren

Auch im Knochen findet man Histokompatibilitätsantigene, die in einem nicht autologen Empfänger immunologische Abwehrreaktionen hervorrufen können. Dies spielt bei xenogenem Material eine größere Rolle als bei allogenem. Durch die Abwehrreaktion kann es zu keinem ungestörten Ablauf der Osteogenese kommen. Urist et al. (1967) nahmen an, daß das BMP selbst antigenen Charakter aufweist.

Einige Autoren (Brooks et al., 1963; Chalmers, 1959; Urist et al., 1967) waren der Ansicht, daß sich die Immunantwort nach allogener Implantation durch Lyophilisieren der entkalkten Matrix vermindern läßt. Elves und Salama (1974) beobachteten auch nach Implantation von lyophilisiertem xenogenem Material eine verringerte immunologische Abwehrreation.

2.5.5 Sauerstoffkonzentration

Knochen- und Knorpelzellen reagieren sehr empfindlich auf die verfügbare Sauerstoffmenge. Die Wirkung ist ganz verschieden und reicht von geringgradiger oder nicht vorhandener Osteogenese bei 5% 0_2 bis zu einer maximalen Osteogenese bei 35% Sauerstoff. Bei einer Konzentration von 95% ist eine geringe Knochenbildung, verbunden mit Osteoklasie und Chondroklasie, zu finden (Shaw and Basset,

1967). 1964 stellte Basset fest, daß eine niedrige Sauerstoffspannung eher zur Differenzierung von Knorpel als von Knochen führt. Zum gleichen Ergebnis kamen Urist (1970), Thorogood und Gray (1975). Dies bedeutet, daß in Bereichen mit ungenügender Blutversorgung eher Knorpel anstatt Knochen gebildet wird.

2.5.6 Physikalische Einflüsse

Anhand klinischer Studien und Untersuchungen an Versuchstieren beobachtete man, daß Knochenwachstum durch elektrische Kräfte stimuliert werden kann (Spadaro, 1977). Jonck und Eriksson (1975) berichteten über eine beschleunigte Frakturheilung nach Erzeugung einer konstanten Spannung im Frakturbereich. In einem anderen Versuch bildete sich nach Implantation von Elektroden in den Markkanal und nach Anlegen einer konstanten Spannung an der Kathode neuer Knochen, während er um die Anode abgebaut wurde.
Im Laufe der natürlichen Frakturheilung stellen elektrische Signale, die vom neuralen Kontrollsystem ausgehen, eine geeignete elektrische Umgebung her (Becker, 1978).
Durch Änderung der Oberflächenladung läßt sich die Fähigkeit der demineralisierten Matrix, Fibroblasten in Chondro- und Osteoblasten zu transformieren, verändern (Reddi and Huggins, 1974). Mechanische Einwirkungen, die eine Gewebedifferenzierung auslösen, waren nach Roux für das faserige Bindegewebe der Zug in häufiger Einwirkung, für die Knorpelgrundsubstanz Zug, Druck und starke Verschiebung der Substanzschichten gegeneinander (Abscherung) und für die Knochengrundsubstanz reiner Druck oder der Wechsel von reinem Druck und Zug (Roux, 1895).

Nachdem die Roux'sche Theorie nicht mehr haltbar war, entwickelte Pauwels (1940) seine Theorie über die Gewebsdifferenzierung bei der Knochenbruchheilung.

Aufgrund seiner Untersuchungen kam er zu dem Ergebnis, daß Dehnung zur Entstehung von Bindegewebe, hydrostatischer Druck zur Knorpelentstehung und der afunktionelle Zustand, chemische Reize oder geringe Verformung zur Knochengewebsbildung führt.
Auch Glucksmann (1942) prüfte den Einfluß mechanischer Kräfte auf die Osteogenese. Er machte die Beobachtung, daß in vitro kultiviertes Skelettgewebe direkt auf mechanische Beanspruchung reagiert. Spannungskräfte fördern die Knochenbildung und steuern die Knochenumbildung. Knorpel antwortet in vitro auf Druck- und Zugkräfte mit einer Reorientierung der Knorpelzellen.

2.5.7 Lokale und systemische Regelmechanismen

Die unmittelbare Umgebung ist ein wichtiges Kriterium im Regelkreis. Im Folgenden sind einige lokale Faktoren, die die Osteogenese beeinflussen, aufgezählt (Reddi, 1982):

1) Zellen, Zell-Zell-Interaktionen
2) Intrazelluläre Faktoren
3) cAMP, Prostaglandine
4) Extrazelluläre Matrix
   a) Kollagen
   b) Proteoglykane
   c) Fibronektin
   d) Osteokalzin
   f) Osteonektin
5) Mineralisationsphase
6) Matrix-Mineral-Zell-Interaktion
7) lokale Wachstumsfaktoren
   a) zelluläre
   b) von der Matrix

Der Regenerationsvorgang des Knochengewebes, der von den biologischen Eigenschaften der Zellen, der Grundsubstanz des Knochengewebes und von Steuerungsfaktoren in der Matrix ausgeht, wird als parakriner Mechanismus der Matrix beschrieben (C. Minkin, 1982; Thielemann, 1985).
Unter parakrinen Substanzen versteht man eine Reihe von biologisch charakteristischen Substanzen, die von der Knochenzelle gebildet und im EZR abgelagert werden. Beim Abbau oder Umbau der Grundsubstanz entfalten diese Substanzen ihre biologische Wirkung auf die benachbarten Zellen und Gewebe und regulieren die Funktion und den Differenzierungszustand der Zellen im Knochengewebe.
Die parakrinen Mechanismen sind dem hormonalen Regulationssystem des Organismus untergeordnet.

Urist et al. (1983) schreiben die Knochenregeneration und -neubildung der Zusammenwirkung von BMP und knochengewebsspezifischen Wachstumsfaktoren BDGF (bone derived growth factors) zu. Das "bone morphogenetic protein" induziert die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoprogenitorzellen. Die BDGF's hingegen (Canalis et al., 1980) üben einen Proliferationsreiz auf die Osteoprogenitorzellen aus. Während die von BMP induzierten Vorgänge irreversibel sind, ist die Wachstumsstimulation der knochengewebsspezifischen Wachstumshormone reversibel und vergleichbar mit der Wirkung eines lokalen Somatomedins (Suzuki and Kato, 1982).
Der "bone chemotactic factor"(BCF) (Somerman et al., 1982) und die "bone derived chemotactic factors" (BDChF's) (Minkin et al., 1982) regulieren die Invasion der mesenchymalen Zellen und die Resorption der implantierten Matrix durch monozytäre Zellen (siehe Kap. 2.2.2.).

Im Folgenden sind systemische Faktoren, die die Knochenbildung beeinflussen, aufgelistet (Reddi, 1982):

1) Wachstumshormone
2) Somatomedine
   Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF's)
3) Insulin
4) Östrogene, Progesteron
5) Cortikosteroide
6) Vitamin D Metaboliten
7) Parathormon
8) Calcitonin

Das hypophysäre Wachstumshormon und die von ihm abhängigen Somatomedine spielen wohl eine überragende Rolle im Skelettwachstum (Raisz et al., 1978).

Weiss und Reddi (1980) prüften den Einfluß von experimentell erzeugtem Diabetes auf matrixinduzierte enchondrale Knochendifferenzierung. Sie beobachteten, daß die Proliferation der Vorläuferzellen vermindert war, was jedoch sowohl durch lokale als auch systemische Insulingabe korrigiert werden konnte. Entsprechend zeigen klinische Untersuchungen, daß Osteoporose bei Diabetikern häufiger vorkommt als in einer vergleichbaren Kontrollgruppe von Nichtdiabetikern.

Die Bedeutung der Östrogene läßt sich an der postmenopausalen Osteoporose bei der Frau veranschaulichen. Östrogene stimulieren zusammen mit Progesteron die Mineralisation von matrixinduziertem enchondral gebildetem Knochen (Reddi, 1982).

Lokal applizierte Corticosteroide verhindern die mesenchymale Zellproliferation und dadurch auch die Chondrogenese (Rath and Reddi, 1979).

Durch 24,25-Dihydroxy-Vitamin D_3 wird die Chondro- und Osteogenese stimuliert. Unter 1,25-Dihydroxy-Vitamin D_3 nimmt der Knochenabbau und die Knochenresorption zu, was durch den Spiegel der sauren Phosphatase angezeigt wird (Wientroub and Reddi, 1982).

In mehreren Versuchen wurde bewiesen, daß die Prostaglandine A, B, E und F die Knochenresorption beschleunigen (Klein and Raisz, 1970; Goodson et al., 1974). Prostaglandin E_2 stimuliert die Knochenresorption am stärksten (Göthlin and Ericsson, 1976).

Durch Parathormon wächst die Tätigkeit des einzelnen Osteoklasten Knochen zu resorbieren. Dies wird wahrscheinlich durch steigende Freigabe von saurer Phosphatase und ähnlichen lysosomalen Enzymen bewirkt (Vaes, 1969). Histochemische Untersuchungen der Ultrastruktur weisen darauf hin, daß Parathormon das lysosomale System stimuliert (Göthlin and Ericsson, 1976). Unter dem Einfluß von Parathormon wächst auch die Zahl der Osteoklasten, da es zu einer beschleunigten Reifung von Vorläuferzellen kommt.

Calcitonin vermindert die Knochenresorption. Es fördert die Anhäufung von Phosphat, welches mit Calcium reagiert und stoppt die Exocytose von lysosomalen Enzymen (Göthlin and Ericsson, 1976).

Weiterhin beeinflussen Thyroxine, Prolaktine, Androgene, Vitamin A, C und K, Mineralien wie Calcium, Zink und Phosphat die Osteogenese.

2.6. BMP und BMPase

2.6.1 Charakterisierung von BMP

Die enchondrale Knochenbildung, die man nach konservativ behandelten Frakturen und nach intramuskulärer Implantation demineralisierter Matrix oder induktiver Gelatine findet, wird einer in der Knochenmatrix enthaltenen Substanz zugeschrieben. Man gab ihr den Namen "bone morphogenetic protein or polypeptid" (BMP) (Urist and Strates, 1971).
BMP stellt einen wesentlichen Teil der kollagenaselöslichen Fraktion nichtkollagener Proteine dar (Leaver et al., 1975) und gehört wahrscheinlich zur Gruppe der Glykoproteine (Urist et al., 1979).

Die native Struktur des Kollagens ist für die Aktivität des Osteogenins nicht notwendig. Die Knorpel- bzw. Knochenbildung wird durch die Überführung des Kollagens in Gelatine noch gesteigert (Urist et al., 1973; Urist et al., 1979).

Durch die Verdauung von Knochengelatine durch Kollagenase geht BMP in Lösung (Urist et al., 1979).

Das dissoziierte BMP kann durch die im Durchmesser 25 µm großen Poren eine Milliporekammer mit 5 Membranen (das entspricht einer Distanz von 450 µm) verlassen und an der Außenseite Knochen bilden. Da bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Kollagenfibrillen in den Poren zu sehen waren, schlossen Urist et al. (1983) Kollagen als Träger oder als wesentlichen Bestandteil der BMP-Struktur aus.

BMP ist reich an Glycin, Tyrosin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Serin und Cystein. Es enthält kein Hydroxyprolin und -lysin, keinen Phosphor und nur Spuren von Pentose (Urist et al., 1975).

Die induktive Aktivität der Matrix wird durch Mercaptoaethanol und Dithiotreitol reversibel blockiert, was auf

Disulfidverbindungen schließen läßt.

Amylase, Hyaluronidase, Chondroitinase und Neuraminidase beeinflussen das Osteogenin in seiner Wirkung nicht. Daher ist es unwahrscheinlich, daß BMP zur Gruppe der sauren Mucopolysaccharide oder Sialoproteine gehört (Urist et al., 1967; Iwata and Urist, 1972; Amitani et al. 1974).

DN-asen und RN-asen haben keinen Einfluß auf die Osteogeninaktivität (Urist et al., 1967).

Da sich BMP nicht mit verdünnten organischen und anorganischen Säuren wie HCl, EDTA und Phosphorsäure aus dem Knochen extrahieren läßt, gehört es zur Gruppe der säureunlöslichen Matrixbestandteile (Urist et al., 1967). Durch nitrierende Säuren wird die Aktivität ausgelöscht.

Physikalische Einwirkungen wie z.B. Hitze über 60°C, radioaktive Strahlen und wechselweise Gefrieren und Auftauen zerstören die morphogenetische Fähigkeit des BMP (Urist et al., 1967; Urist, 1973).

Salzlösungen (Ca-, Lithium-, Zinkchlorid, KSCN) extrahieren den löslichen Teil der Proteinpolysaccaride aus der Knochenmatrix und haben im allgemeinen keinen Einfluß auf die osteoinduktive Eigenschaft von Knochen. Eine Ausnahme bildet das Guanidiniumchlorid (Urist et al., 1973). Extraktion der Matrix mit 4M GuHCl-Lsg - oder auch mit 8M Urea/1M NaCl oder 1% $NaDodSO_4$-Lsg - führt zu einem Verlust der knocheninduzierenden Fähigkeit (Sampath and Reddi, 1981). BMP wird durch GuHCl vollständig extrahiert (Urist et al., 1983).

Rekonstruktion von in 4M GuHCl gelöstem BMP mit dem Extraktionsrest oder höhermolekularen Proteinen führt zu einer kompletten Wiederherstellung der biologischen Aktivität (Sampath and Reddi, 1981; Urist et al., 1983).

Solche Implantate werden langsamer resorbiert und rufen relativ große Knochenablagerungen hervor.

Takaoka et al. (1980) und Hanamura et al. (1980) waren die ersten, die eine enchondrale knochenerzeugende Fraktion mittels GuHCl Extraktion aus Mäuseosteosarkom beschrieben.
Takaoka et al. isolierten ein Protein mit einem Molekulargewicht von 22000 Daltons. Hanamura et al. fanden Osteosarkom-BMP in der Proteinfraktion mit einem Molekulargewicht von 12500 bis 30000 Daltons. Urist und seine Arbeitskollegen stellten dagegen in ihrem Versuch 1983 fest, daß die vorherrschende Komponente der Proteinfraktionen mit BMP-Aktivität ein Molekulargewicht von 17500 Daltons besitzt.

2.6.2 Charakterisierung der BMPase

Wenn man Knochen einige Zeit bei neutralem pH aufbewahrt, kommt es zu einem raschen temperatur- und zeitabhängigen Rückgang der osteogenetischen Aktivität (Urist et al., 1974). In saurer Pufferlösung bleibt die induktive Wirkung des Knochens längere Zeit weitgehend erhalten.

Die Abhängigkeit vom pH-Wert läßt auf einen Abbau des BMPs durch eine neutrale Protease schließen. Urist postulierte deshalb das Vorhandensein einer BMPase (Urist et al., 1972; Urist, 1973).
Dieses Enzym ist bei 2°C und bei pH 7,0-7,4 hochaktiv (Urist, 1973). Durch Erhitzen auf 50°C wird es inaktiviert. Mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch oder Lithiumchlorid kann man es extrahieren oder inhibieren (Urist et al., 1973).

Der BMP-Abbau kann durch Jodessigsäure IAA (3 molar) in Phosphatpuffer oder EDTA gestoppt werden. P-Chlorquecksilberbenzoesäure und Cystein hemmen die BMPase reversibel (Urist, 1973).

Die Wirkung der BMPase ist mit der von Trypsin vergleichbar. Sie löst jedoch kein Kollagen und ist spezifisch für den Osteogeninabbau (Urist et al., 1973).

2.7 Bestandteile des Knochens

Der Knochen setzt sich aus Zellen, organischer Knochenmatrix und anorganischen Bestandteilen zusammen. Knochenspezifische Zellen sind die Osteoblasten, die die organische Matrix synthetisieren, die Osteocyten, die durch Einbettung von Osteoblasten in Osteoid entstehen und die Osteoklasten, die die Knochensubstanz abbauen. (Fleisch, 1966).

Die organische Knochenmatrix bleibt nach Entfernung der Mineralbestandteile und Zellen aus dem Knochen zurück und macht in etwa 24% des Trockengewichtes aus.

Zusammensetzung der organischen Knochenmatrix:

Kollagen	ca. 88,5%
Resistantproteine	ca. 1%
Chondroitinsulfat	ca. 0,8%
Sialoproteine	ca. 0,8%
Peptide	ca. 0,5%
CPS-Glucoproteine	ca. 0,4%
Lipide	ca. 0,4%
Glucoproteine u.a. nicht klassifizierte Substanzgruppen	ca. 7,5%

Als nicht-kollagene Matrix (NCM) werden die neben Kollagen vorliegenden Bestandteile bezeichnet.

Das Knochenmineral setzt sich aus kleinen Kristallen, die hauptsächlich aus Calciumphosphat aufgebaut sind, zusammen.

3. Problemstellung

Bei Knochenübertragungen ist man heute immer noch auf das nur begrenzt vorhandene autologe Material angewiesen. Weltweit wird deshalb an der Anwendbarkeit von allogenem und xenogenem Material geforscht.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Behandlung von Schweine- und Rinderknochen mit Trifluoressigsäure und Guanidiniumchlorid. Sowohl die nach der Extraktion verbliebene Knochenmatrix als auch die in Lösung gegangenen Bestandteile, werden in der Ratte auf osteogenetische Aktivität untersucht.

Thielemann (unveröffentlichte Befunde) erzielte mit der Implantation von TCA präparierter Matrix positive Ergebnisse. Da TCA nur mit einem erheblichen Aufwand (Soxhlettieren) wieder entfernt werden kann, hofft man mit der flüchtigen Trifluoressigsäure dieses aufwendige Verfahren zu umgehen.

1980 benutzten Hanamura und seine Mitarbeiter 4M GuHCl Lösung, um die osteoinduktiven Substanzen aus Mäuseosteosarkomen und Rattenknochen zu extrahieren. Mittels CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation erreichten sie eine partielle Reinigung.
In Anlehnung an diese Arbeit wird die Guanidiniumchlorid-Extraktion mit Schweine- und Rinderknochen durchgeführt.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Tiermaterial

männliche SPF-Sprague-Dawley-Ratten von der Gesellschaft für medizinische Versuchstierzuchten mbH, Dr. Ivanovas, Kissleg im Allgäu, BRD
Gewicht: 280-350 g
Ernährung: Altromin-R Standarddiät (Altromin GmbH, Lage, BRD) und Wasser

Röhrenknochendiaphysen von frisch geschlachteten Schweinen und Rindern (Schlachthof, Tübingen, BRD)

4.1.2 Geräte

Fraktionssammler (LKB-Ultrorac Fraktion Collektor, Bromma, Schweden)

Lyophilisator (Betal, Christ, Osterode/Harz, BRD)

Magnetrührer (Bachhofer, Reutlingen, BRD)

Messerhomogenisator (max. 10000 UpM, Bühler, Tübingen, BRD)

Monitor (LKB-Uvicord III 2098, Bromma, Schweden)

peristaltische Pumpe (peristaltic pump 3600-Colora, Lorch, BRD)

pH-Meter (Digitalimeter DIGI 610, WTW, Weilheim)

Potentiometerschreiber (Metrawatt GmbH, Nürnberg, BRD)

Schreiber (Colora, Lorch)

Schüttelinkubator (Köttermann, Haningen, BRD)

Spektralphotometer (PM 4, Zeiss, Oberkochen, BRD)

Wasserbad (3047, Köttermann, Haningen)

Zentrifugen (Beckman, Model J2-21 Centrifuge; Beckman, Model L5-75 Ultracentrifuge, Beckman Instruments GmbH, 8000 München, BRD)

4.1.3 Chemikalien und Medikamente

Äthanol (Merck, Darmstadt, BRD)

Äther (Höchst, Frankfurt)

6-Aminocapronsäure (Serva, Feinbiochemica GmbH und Co. 6900 Heidelberg)

Ammoniumhydrogencarbonat (Merck)
Benzol (Merck)
Cäsiumchlorid (Merck)
Chloroform (Merck)
Calciumazetat (Merck)
Eisen-III-Chlorid (Merck)
Essigsäure (Merck)
N-Ethylmaleimid (Serva)
Guanidiniumchlorid (Merck)
Haematoxilin (Merck)
Jodacetamid (Serva)
Lichtgrün (Merck)
Merck-1-Test alkalische Phosphatase (Merck)
Merfen (Zyma GmbH, München)
Methanol (Merck)
Natriumazid (Merck)
Natriumthiosulfat (Merck)
Nebacetin (Byk Gulden Lomberg, Konstanz)
Nembutal 60 (Abbott, Ingelheim)
Panceau-Fuchsin, Masson (Chroma GmbH, Stuttgart, BRD)
PMSF (=Phenylmethylsulfonylfluorid, Serva)
Phosphormolybdän (Merck)
Salzsäure (Merck)
Silbernitrat (Baker Chemikalien, Groß-Gerau, BRD)
Titriplex (=EDTA, Merck)
Trifluoressigsäure (Merck)
Trispuffer (= Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan, Riedel-De Haen AG, Seelze-Hannover)
Xylol (Merck)

Alle verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität.

4.1.4 Sonstiges

Chromatographie-Säule (Pharmacia, Freiburg/Breisgau)
Mersilennaht ($\frac{4.0}{1.5}$ 75 cm, Ethicon, Hamburg)

Sephadex G 15 (Pharmacia Fine Chemicals; G 15: dry bead diameter: 40-120 µm, Fractionation range (MG): peptides and globular proteins -1500; Dextrans -1500)

Visking-Dialyse-Schlauch (27/32 Serva)

Fluoranalyse: Analytische Laboratorien
Fritz-Pregl-Straße 24
5270 Gummersbach 1 Elbach (Germany)

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung des Ausgangsmaterials

Röhrenknochendiaphysen von Schweinen und Rindern werden ein paar Stunden nach der Schlachtung mit dem Skalpell von Sehnen, Muskelteilen und Periost befreit und mit einer langen Pinzette entmarktet.
Mit einem Hammer zertrümmert man die Knochen in möglichst kleine Bruchstücke (1 cm^2), die dann in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (1:1) bei 4°C entfettet werden.

Mit dem Chloroform-Methanol-Gemisch werden Lipide, Lipoproteine, antimorphogenetische und zum größten Teil auch antigene Eigenschaften des Knochens entfernt (Urist and Strates, 1970; Urist et al., 1974; Urist et al., (1975).

Die Entkalkung der Röhrenknochen erfolgt mit 0,6 n-HCL (Urist et al., 1967; Späth, 1981). Insgesamt wird 36 Std. unter kräftigem Rühren entkalkt, wobei man die Salzsäurelösung alle 6 Std. erneuert. Danach sind die Bruchstücke vollständig demineralisiert.
Diese Entmineralisierung führt zu einer besseren Aufschließbarkeit der Matrix (Urist et al., 1967).

Bei der Dekalzifizierung des Knochens mit HCl werden neben der Entfernung der Apatitbestandteile auch säurelösliche Proteine, Phosphorproteine und zum Teil saure Mucopolysaccharide in Lösung gebracht (Urist et al.,1973). Da bei dieser Konzentration der HCl eine saure Hydrolyse oder Denaturierung von Proteinen nicht stattfindet, bleibt die osteoinduktive Fähigkeit des demineralisierten Knochens erhalten (Urist et al., 1974).

Anschließend werden die Bruchstücke 1 Std. lang unter fließendem Wasser gewaschen, um die Salzsäure zu entfernen.

Nun zerschneidet man die Knochenstückchen mit dem Skalpell in 0,5 mm^2 große Partikel und trocknet sie an der Luft (siehe Abb. 2).

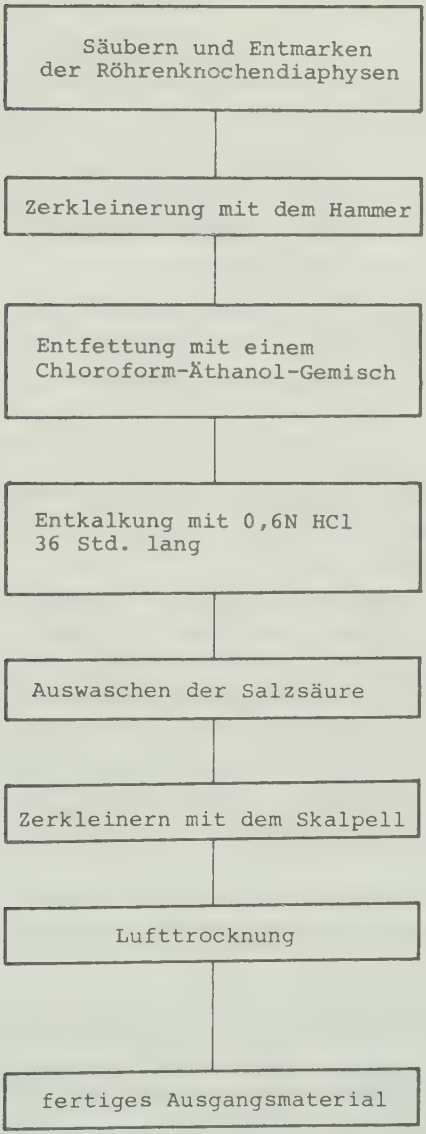


Abb. 2: Herstellung des Ausgangsmaterials

4.2.2 TFA-Extraktion

Abb. 3 zeigt den Ablauf der TFA-Extraktion.
Das Ausgangsmaterial wird im Verhältnis 1:10 mit 0,5 molarer TFA gemischt und bei 37°C unter ständigem Schütteln verschieden lang inkubiert (12 Std., 24 Std. und 36 Std.). Die anschließende Zentrifugation von 20 min. bei 10000 rpm führt zur Trennung der in Lösung gegangenen Bestandteile vom Rest der Knochenpartikel.

Das Sediment wird je nach Inkubationszeit als TFA-12 Std.-, TFA-24 Std.- und TFA-36 Std.-Rest der Überstand als TFA-12 Std.-, TFA-24 Std.- und TFA-36 Std.-Löslich bezeichnet.

Nach viermaligem Waschen wird der TFA-Rest eingefroren. Für eine Fluorbestimmung, die Aufschluß über die im TFA-Rest verbliebene Trifluoressigsäure gibt, wird eine kleine Menge lyophilisiert.
Der Überstand wird wie der Rest nach dem Zentrifugieren zur Konservierung eingefroren. Ebenfalls werden 3 kleine verschieden lang lyophilisierte Teilmengen (48 Std., 144 Std. und 192 Std.) zur Fluorbestimmung an ein externes Labor weitergegeben. Durch diese Analyse soll festgestellt werden, ob die Gefriertrocknung ein geeignetes Verfahren darstellt, die Trifluoressigsäure zu verflüchtigen.

Die TFA-Menge wird wie folgt ermittelt:

Molekulargewicht der TFA ≙ 114,02
Molekulargewicht von 3 Fluoratomen ≙ 57

daraus folgt :

TFA-Gehalt = 2 x Fluorgehalt

Die Analysen ergeben, daß nur wenig der TFA auf diese Weise entfernt werden kann. Daher ist man gezwungen, die im Folgenden beschriebenen Verfahren anzuwenden.

Der TFA-Rest wird bei 4°C 24 Std. lang gegen große Mengen

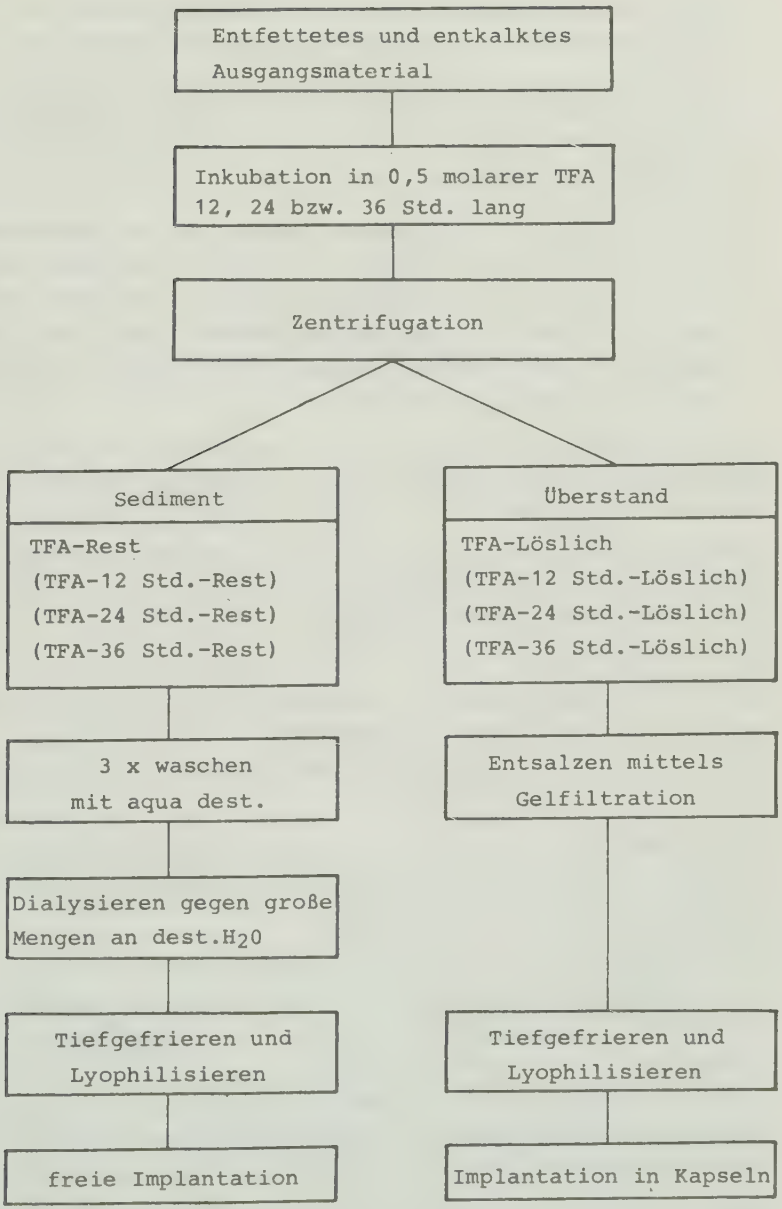


Abb. 3: Ablauf der TFA-Extraktion

an destilliertem Wasser dialysiert. Das Inhaltsvolumen des Dialyseschlauchs wird so bemessen, daß er nur zur Hälfte gefüllt ist. Nach Zentrifugation des Dialysates wird der Überstand dekantiert, das Sediment eingefroren und anschließend lyophilisiert. Von einer kleinen Probe wird eine Fluorbestimmung gemacht.

Der durchschnittliche Porendurchmesser der semipermeablen Dialyseschlauchmembran beträgt 15 bis 20 Å. Moleküle über 10000 bis 20000 Daltons können nicht mehr hindurchdiffundieren. Außer durch die Größe der Moleküle wird das Diffusionsverhalten durch deren Form in der Lösung und ihrer pH-abhängigen Ladung bestimmt.

Der Diffusionsvorgang ist abhängig von den Eigenschaften der Membran (Dicke, Adsorptionseigenschaften, Ionen- und Austauscheigenschaften, Porenform und -zahl), von der Temperatur, vom Lösungsmittel (pH, Viskosität, Lösungseigenschaften), vom Konzentrationsgradienten zwischen Innen- und Außenfläche der Membran und von der effektiven Austauschfläche.

Alle aufgeführten Faktoren zusammen bewirken, daß bestimmte Moleküle durch die Membran diffundieren können oder im Dialyseschlauch zurückgehalten werden (Craig und Königsberg, 1961).

Da die TFA wahrscheinlich als Salz gebunden im Material vorliegt, wird das TFA-Lösliche zur Entsalzung über eine Gelsäule gekippt.

Entsalzen mittels Gelfiltration bedeutet eine Trennung nach Molekülgröße. Kleine Moleküle (hier Salze) wandern in der Säule langsamer als große, da sie in das Gelbett eindringen können und ihre Wanderung im Netzwerk des Dextrans verzögert wird. Dagegen strömen große Moleküle, deren Durchmesser den Porendurchmesser der Gelteilchen übersteigt, rasch an ihnen vorbei.

Sephadex G 15 eignet sich besonders zum Entsalzen, da es eine hohe Durchflußrate und eine stark verzweigte Mole-

külstruktur besitzt. Ins Gelbett gelangen nur Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 1500.

Um Interaktionen zwischen der aufzutrennenden Lösung und ionischen Gruppen der Gelmatrix zu verhindern, verwendet man als mobile Phase einen Puffer. Ammoniumhydrogencarbonat läßt sich ohne viel Aufwand durch Lyophilisieren der Lösung wieder entfernen und eignet sich deshalb sehr gut.
Die Gelfiltration wird folgendermaßen durchgeführt:
Die leere Säule spült man gründlich mit destilliertem Wasser. Nachdem man am unteren Ende den Adapter angeschraubt hat, wird sie senkrecht aufgestellt.

Der frisch angesetzte 0,5 molare Ammoniumhydrogencarbonatpuffer und das Sephadex G 15 werden mit einer Wasserstrahlpumpe entgast.

Man füllt die Säule einige cm mit Puffer und schüttet dann das Puffer-Gel-Gemisch mittels einer Einfüllröhre vorsichtig in die Säule. Es sollten dabei keine Luftblasen entstehen. Die Gelkörnchen setzen sich in der Flüssigkeit langsam ab. Das Gel darf dabei nicht trocken laufen.

Nach etwa 2 Std. ist der Absetzvorgang beendet. Der Abstand zwischen oberem Gelrand und oberem Säulenende sollte 5 bis 10 cm betragen.

Die Säule wird nun bis zum Überlaufen mit entgastem Puffer gefüllt, damit beim Anbringen des oberen Adapters keine Luftblasen entstehen. Er wird so fixiert, daß zwischen ihm und dem Gelrand ein Abstand von 2 bis 3 mm verbleibt.

Falls Risse und Luftblasen entstehen, muß die Säule neu angesetzt werden.

Vor Auftragung der Probe wird die Säule ungefähr 6 Std. mit Puffer äquilibriert. Dazu wird mit einer peristaltischen Pumpe bei Drehzahl 1 Puffer zu- und abgeführt.

Die Probe sollte nicht mehr als 30 % des totalen Gelbett-

volumens betragen. Sicherheitshalber trägt man nur 20 % des Gelbettvolumens auf.

Gelbettvolumen $V = r^2 \times h$

mit r = 2,5 cm und h = 50 cm ergibt sich

$V = 98{,}125\ cm^3$

Die beim Durchwandern der Säule entstandenen Fraktionen werden durch einen Monitor geleitet und anschließend von einem Fraktionssammler in Gefäßen aufgefangen (siehe Abb.4).

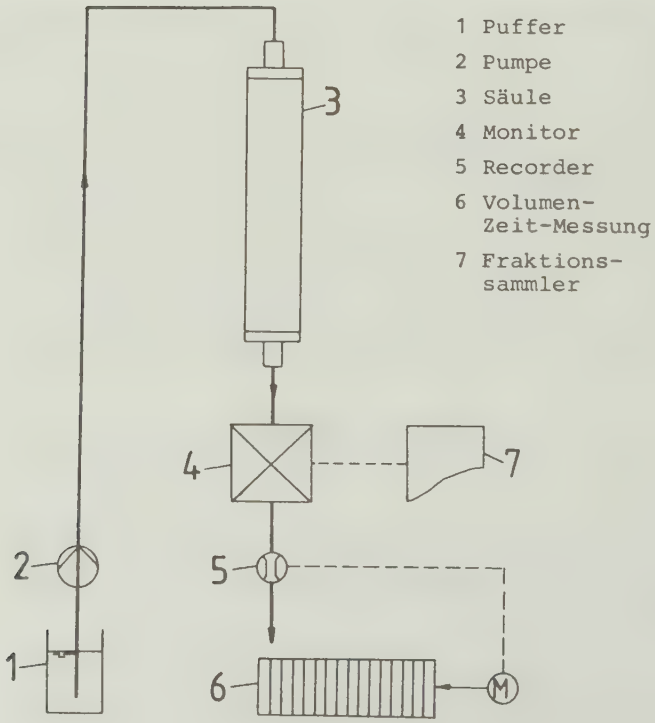


Abb. 4: Schematische Darstellung der Säulenapparatur

Der Monitor besteht aus einer Lichtquelle mit einem Filter für 254 und 276 nm Durchlaß und einer Photozelle. Das Säuleneluat wird von Licht beider Wellenlängen durchstrahlt. Ein Teil wird absorbiert. Der Rest wird als Transmission gemessen und von einem Schreiber als Extinktion kontinuierlich aufgezeichnet. Mittels dieser graphischen Darstellung lassen sich die einzelnen Fraktionen und ihre Absorption bei den verwendeten Wellenlängen erkennen. Beim Entsalzen entsteht eine zweigipflige Kurve, anhand derer man entscheiden kann, wann die höhermolekularen Substanzen im Fraktionssammler aufgefangen werden und wann das Salz die Säule verläßt (siehe Abb. 5).

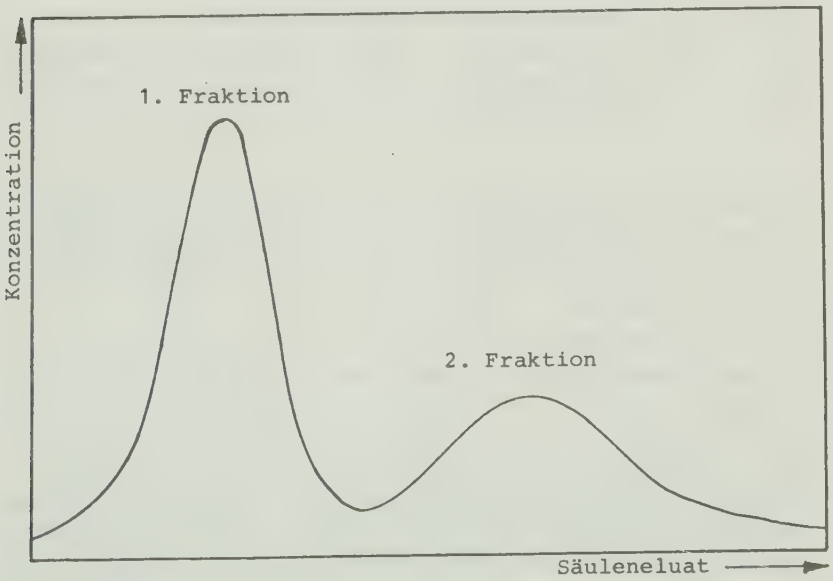


Abb. 5: Entsalzung der Proteinlösung

Die 1. Fraktion (Proteinfraktion) wird gefriergetrocknet und an einer kleinen Teilmenge eine Fluorbestimmung durchgeführt.

Die 2. Fraktion (Salz) wird weggeschüttet.

Die Analysen des dialysierten und entsalzten Materials ergeben, daß sich nur noch geringe Mengen Fluor darin befinden. Somit kann das Material zur Implantation abgewogen werden.

Die Auswertung erfolgt histologisch und durch Messung der Aktivität der AP.

4.2.3 Extraktion mit 4 molarer GuHCl-Lsg. und Cäsiumchlorid-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

4.2.3.1 Guanidiniumchloridextraktion

Abb. 6 zeigt den Ablauf der GuHCl-Extraktion.
Die kleingeschnittene Knochenmatrix wird unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer 16 Std. lang bei 4°C mit 4 molarer GuHCl-Lösung extrahiert (Knochenmatrix : Lösung = 1 : 10).

Um die osteogenetische Aktivität zu erhalten, fügt man folgende Enzyminhibitoren zur Hemmung der BMPase hinzu:
- Calciumazetat (1mM)
- Jodacetamid IAM (3mM)
- Natriumazid NaN_3 (10mM)
- Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF (1mM)
- EDTA (10mM)

Man stellt einen pH von 7,0 ein.
Nach der Extraktion wird 60 min. bei 50000 g zentrifugiert, um die GuHCl-löslichen Bestandteile von den unlöslichen zu trennen. Das Sediment P_1, das aus den unlöslichen Substanzen besteht, wird mit kaltem aqua dest. gewaschen und das Waschwasser anschließend abzentrifugiert. Der so entstandene Rest P_2 wird für die Implantation tiefgefroren und lyophilisiert.

Der Überstand S_1 mit den GuHCl-löslichen Substanzen wird 18 Std. lang bei 4°C gegen große Mengen an destilliertem

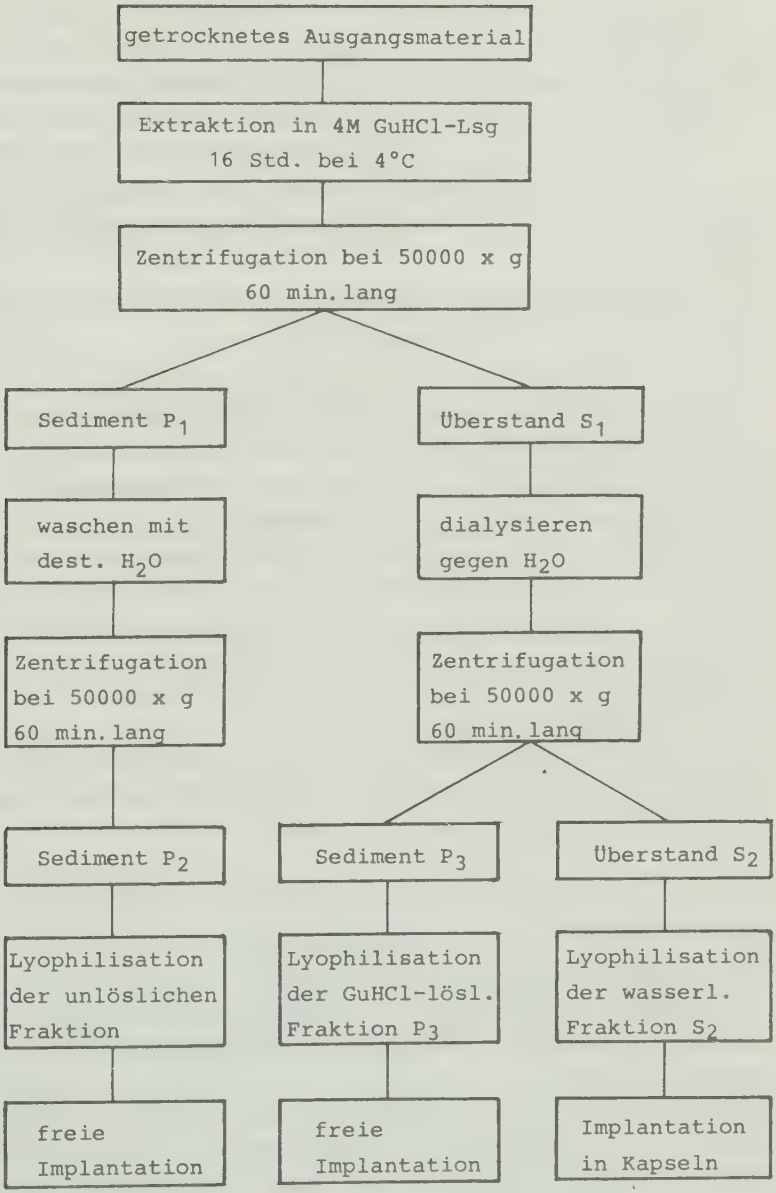


Abb. 6: Ablauf der GuHCl-Extraktion

Wasser dialysiert, um das Salz zu entfernen. Im Dialyseschlauch bildet sich allmählich ein weißer flockiger Niederschlag. Durch die Entfernung des Guanidiniumchlorids fallen die GuHCl-löslichen Bestandteile wieder aus.
Die Zentrifugation des Schlauchinhaltes trennt die wasserlösliche Fraktion S_2 von der wasserunlöslichen Fraktion P_3. Beide werden gefriergetrocknet und anschließend implantiert.

Dieses Extraktionsverfahren wird sowohl mit Schweine- als auch mit Rinderknochen durchgeführt.

Eine 4 molare Guanidiniumchloridlösung greift erheblich in die Struktur der Knochenmatrix ein. Sie denaturiert Proteine einschließlich Kollagen und extrahiert hauptsächlich Proteoglykane, Glycoproteine und Teile des Kollagens. Der Extrakt enthält daher signifikante Mengen an neutralen Zuckern und Hydroxyprolin, dagegen relativ wenig Glucosaminglycane (Anastassiades et al., 1978).

Nach Tanfold (1968) zerstört GuHCl keine kovalenten Bindungen und läßt das Bindegewebe auch bei hohen Konzentrationen intakt.

Die Auswertung der Explantate erfolgt durch Anfertigung von histologischen Präparaten und Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

4.2.3.2 Cäsium-Chlorid-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Die Dichte-Gradienten-Zentrifugation oder isopyknische Ultrazentrifugation stellt ein Verfahren zur Trennung von Partikeln (Gemische von Proteinen, andere Makromoleküle, Organellen und Viren) aufgrund unterschiedlicher Dichte dar.
Während der Zentrifugation bewirkt das angelegte Zentrifugalfeld eine Sedimentation des Gradientenmaterials und der darin befindlichen Partikel. Nach einiger Zeit entsteht ein Sedimentations-Diffusionsgleichgewicht des

Alkalisalzes (hier CsCl), und die Partikel sedimentieren und flottieren zu dem Punkt des Gradienten, der ihrer Auftriebsdicht entspricht. Auf diese Weise sind die Partikel verschiedener Dichte voneinander getrennt und können anschließend fraktioniert werden.

Die CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation zeigt eine teilweise Reinigung von BMP (Hanamura et al., 1980).

Man benötigt als Ausgangsmaterial 4M GuHCl-Knochenextrakt (S_1).

4.2.3.2.1 Dissoziativer Gradient

Das 4M GuHCl-Extrakt wird auf eine Dichte von 1,5 g pro ml gebracht, indem man 0,59 g CsCl pro g Lösung hinzufügt. Anschließend zentrifugiert man bei 4°C und 3 x 10^4 rpm 48 Std. lang. Der Inhalt der Zentrifugationsröhrchen wird in 4 Fraktionen aufgeteilt (siehe Abb. 7):
Fr. 1-D, Fr. 2-D, Fr. 3-D und Fr. 4-D.
Fr. 1-D ist ein dünner obenauf schwimmender Gelfilm, den man mit destilliertem Wasser wäscht und dann gefriertrocknet. Die anderen Fraktionen werden vorsichtig einzeln mit einer Spritze abgezogen und 16 Std. bei 4°C gegen große Mengen an destilliertem Wasser dialysiert, um die Salze GuHCl und CsCl zu entfernen. Für die Implantation werden sie gefriergetrocknet.

4.2.3.2.2 Assoziativer Gradient

Das 4M GuHCl-Extrakt wird bei 4°C 16 Std. lang gegen die 100 fache Volumenmenge an 0,05M Trispuffer dialysiert (pH 7,0), der folgendes enthält:
- GuHCl 0,5M
- EDTA 10mM
- N-Ethylmaleimid 10mM
- PMSF 1mM
- 6-Aminocapronsäure 0,1mM

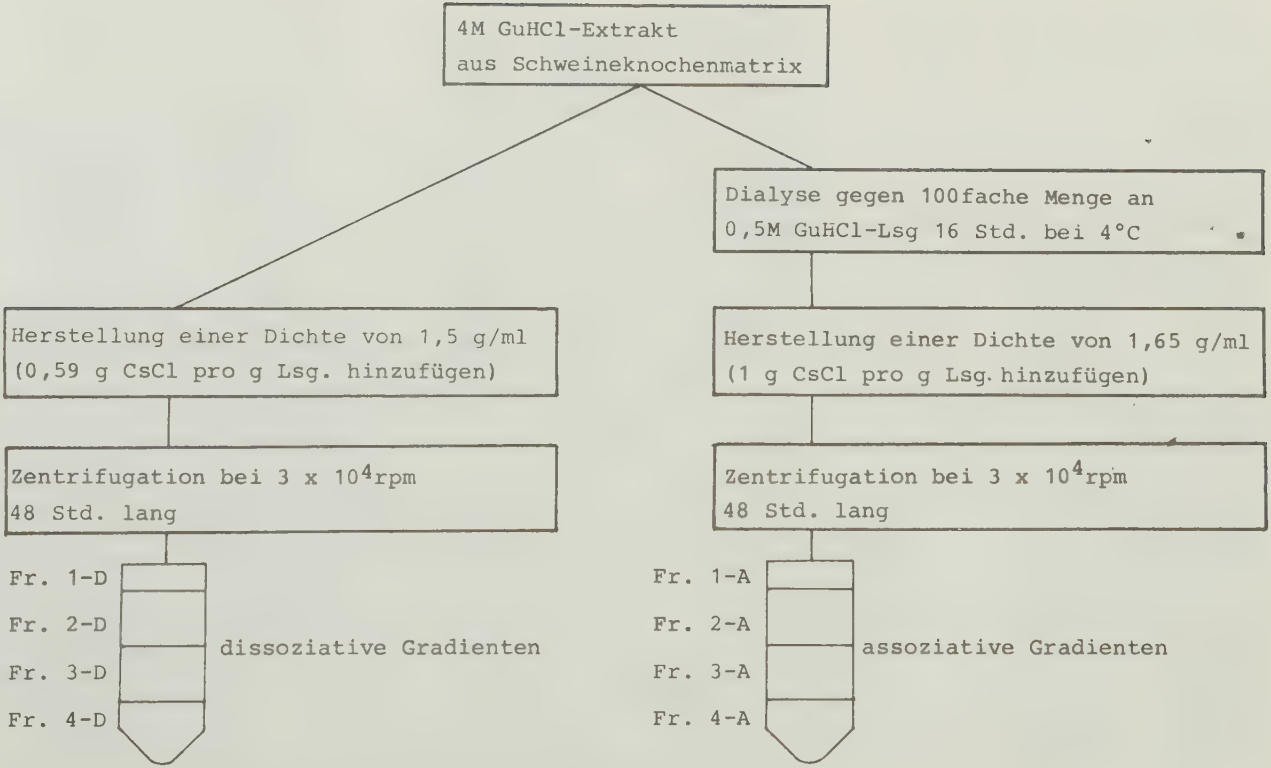


Abb. 7: Ablauf der CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Um eine Dichte von 1,65 g pro ml zu bekommen, fügt man nach der Dialyse 1 g CsCl pro g Lösung hinzu. Anschließend wird 48 Std. bei 4°C und 3 x 10^4rpm zentrifugiert.

Den Inhalt des Zentrifugationsröhrchens teilt man in 4 Fraktionen Fr. 1-A, Fr. 2-A, Fr. 3-A und Fr. 4-A (siehe Abb. 7), die einzeln mit der Spritze abgezogen und vor der Gefriertrocknung wie unter 4.2.3.2.1 gegen große Mengen an destilliertem Wasser dialysiert werden.

Die Auswertung erfolgt histologisch.

4.2.4 Implantationstechnik

Die Ratten werden mit Äther betäubt und anschließend mit Nembutal narkotisiert. Man spritzt dazu 0,08 ml pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal.
Nach der Rasur der Bauchhaut werden die Tiere auf eine Korkplatte gelegt und an allen vier Extremitäten fixiert. Das Operationsgebiet wird mit Merfen desinfiziert.
Ca. 2 cm unterhalb des Rippenbogens und beiderseits der Medianlinie legt man einen 2 cm langen Hautschnitt an. Das Bindegewebe auf der Fascie des Musculus obliquus externus abdominis wird nach beiden Seiten hin abpräpariert. Nun wird der Muskel mit seiner Fascie auf eine Länge von ca. 10 mm durchtrennt. Zwischen Musculus obliquus externus abdominis und Musculus obliquus internus abdominis wird nach lateral auf beiden Seiten eine Tasche gebildet, die nur so groß sein darf, daß das Implantat gerade aufgenommen werden kann.
Nach Einbringung des Implantates werden in jede Muskeltasche 2 Tropfen Nebacetin (Bacitracin) geträufelt.

Nach Urist et al. (1975) beeinflußt Bacitracin den Induktionsvorgang nicht.

Die Tasche wird mit einer fortlaufenden Mersilennaht wieder verschlossen. Nach der Hauptnaht desinfiziert man das Operationsgebiet noch einmal mit Merfen. Bis zur Explantation werden die Tiere in markierten Käfigen gehalten.

4.2.5 Implantatserien

4.2.5.1 Serie 1: Sediment und Überstand nach Extraktion mit Trifluoressigsäure

Entfettete und entkalkte Knochenmatrix inkubiert man 12 Std., 24 Std. und 36 Std. lang mit 0,5 molarer TFA. Nach der Zentrifugation wird der jeweilige Überstand mittels Gelfiltration das Sediment mittels Dialyse entsalzt. Die lyophilisierten Sedimente TFA-12 Std.-Rest, TFA-24 Std.-Rest und TFA-36 Std.-Rest werden in 100 mg Portionen frei implantiert, wohingegen die gefriergetrockneten Überstände TFA-12 Std.-Löslich, TFA-24 Std.-Löslich und TFA-36 Std.-Löslich in Gelatinekapseln mit 50 mg Inhalt implantiert werden. Die Implantate verbleiben 7, 10, 11 und 16 Tage in den Ratten (Näheres siehe Übersicht).

Die Explantate werden histologisch und durch Bestimmung der alkalischen Phosphatase ausgewertet.

Übersicht über die Implantate der Serie 1:

TFA-12 Std.-Rest : 12 Implantate à 100 mg
freie Implantation
für die Bestimmung der AP:
Explantation nach 10 Tagen
(6 Explantate)
für die Histologie:
Explantation nach 7, 11 und 16 Tagen
(6 Explantate)

TFA-12 Std.-Löslich:	12 Implantate à 50 mg Implantation in Kapseln für die Bestimmung der AP: Explantation nach 10 Tagen (6 Explantate) für die Histologie: Explantation nach 7, 11 und 16 Tagen (6 Explantate)
TFA-24 Std.-Rest:	12 Implantate à 100 mg freie Implantation für die Bestimmung der AP: Explantation nach 10 Tagen (6 Explantate) für die Histologie: Explantation nach 7, 11 und 16 Tagen (6 Explantate)
TFA-24 Std.-Löslich:	12 Implantate à 50 mg Implantation in Kapseln für die Bestimmung der AP: Explantation nach 10 Tagen (6 Explantate) für die Histologie: Explantation nach 7, 11 und 16 Tagen (6 Explantate)
TFA-36 Std.-Rest:	6 Implantate à 100 mg freie Implantation Explantation nach 21 Tagen histologische Auswertung
TFA-36 Std.-Löslich:	8 Implantate à 50 mg Implantation in Kapseln Explantation nach 21 Tagen histologische Auswertung

4.2.5.2 Serie 2: GuHCl-lösliche und GuHCl-unlösliche Bestandteile der Schweineknochenmatrix

Zur Herstellung der Knochenmatrix wird 16 Std. mit 4 molarer GuHCl-Lsg. extrahiert. Nach der Zentrifugation erhält man den Überstand S_1 und das Sediment P_1. Das gewaschene Sediment P_2 wird in 50 mg Portionen implantiert und nach 10 Tagen zur Messung der alkalischen Phosphatase wieder explantiert.

S_1 dialysiert man gegen große Mengen an destilliertem Wasser und erhält so nach Zentrifugation des Dialysenschlauchinhaltes die GuHCl-lösliche Fraktion P_3 und eine wasserlösliche Fraktion S_2.

Von der lyophilisierten GuHCl-löslichen Fraktion P_3 werden jeweils 50 mg in die Versuchstiere implantiert. Für die Bestimmung der AP wird nach 10 Tagen und zur Durchführung einer Histologie nach 10, 15 und 21 Tagen explantiert.

Von S_2 wird jeweils eine in Gelatinekapseln befindliche Menge von 22,5 mg implantiert, nach 10 Tagen wieder explantiert und die Bestimmung der AP durchgeführt.

Übersicht über die Implantate der Serie 2:

Sediment P_2: 5 Implantate à 50 mg
freie Implantation
Explantation nach 10 Tagen
Auswertung durch Messung der AP

Sediment P_3: 10 Implantate à 50 mg
1 Ratte gestorben
freie Implantation
für die Bestimmung der AP:
Explantation nach 10 Tagen (6 Explantate)
für die Histologie:
Explantation nach 10, 15 und 21 Tagen
(3 Explantate)

Überstand S_2 : 2 Implantate à 22,5 mg
Implantation in Kapseln
Explantation nach 10 Tagen
Auswertung durch Bestimmung der AP

4.2.5.3 Serie 3: GuHCl-lösliche Bestandteile der Rinderknochenmatrix

In der Serie 3 wird anstatt mit Schweineknochen die Extraktion mit Rinderknochen durchgeführt.
Nur Sediment P_3 wird implantiert und nach 3 und 4 Wochen wieder explantiert.
Die Auswertung der Explantate erfolgt histologisch.

Übersicht über die Implantate der Serie 3:

Sediment P_3: 12 Implantate à 50 mg
freie Implantation
Explantation von 6 Implantaten
nach 3 Wochen
Explantation von 6 Implantaten
nach 4 Wochen
histologische Auswertung

4.2.5.4 Serie 4: Fraktionen des 4 molaren GuHCl-Extraktes nach CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

4 molares GuHCl-Extrakt wird im 1. Versuch auf eine Dichte von 1,5 g pro ml gebracht. Nach der Ultrazentrifugation teilt man den Inhalt des Zentrifugenröhrchens in 4 Fraktionen: Fr.1-D, Fr.2-D, Fr.3-D und Fr.4-D. Diese werden nach der Gefriertrocknung implantiert, nach 15 Tagen explantiert und für die histologische Auswertung anschließend fixiert.

Im 2. Versuch stellt man mit CsCl eine Dichte von 1,65 g pro ml her und erhält nach der Zentrifugation 4 Fraktionen: Fr.1-A, Fr.2-A, Fr.3-A und Fr.4-A.
Fr.1-A implantiert man nach der Gefriertrocknung.
Die Ausbeute aus den Fraktionen 2-A, 3-A und 4-A ist für eine Implantation zu gering.

Übersicht über die Implantate der Serie 4:

Versuch 1:	Fr.1-D:	1 Implantat à 50 mg Implantation in einer Kapsel Explantation nach 15 Tagen histologische Auswertung
	Fr.2-D:	3 Implantate à 26 mg Implantation in Kapseln Explantation nach 15 Tagen histologische Auswertung
	Fr.3-D:	2 Implantate à 25 mg Implantation in Kapseln Explantation nach 15 Tagen histologische Auswertung
	Fr.4-D:	1 Implantat à 15 mg Implantation in einer Kapsel Explantation nach 15 Tagen histologische Auswertung
Versuch 2:	Fr.1-A:	2 Implantate à 34 mg Implantation in Kapseln Explantation nach 15 Tagen histologische Auswertung

4.2.5.5 Kontrollversuche

Um die osteogenetische Wirkung der Implantate als stoffspezifisch nachzuweisen und um auszuschließen, daß der Befund einer Knochenneubildung am Implantationsort Folge der Manipulation oder der unspezifischen Reizung durch eingebrachte Implantate ist, wurde bereits von Thielemann (1985) eine Reihe von Kontrollen durchgeführt:

- alleinige Präparation der Implantattasche
- Präparation der Tasche mit Hämatom
- Implantation allogener Bauchdeckenfaszie
- Implantation von Quarzpulver
- Implantation von Gelatine
- Implantation von pulverisierter Tricalciumphosphatkeramik
- Implantation von Cellulose
- Implantation von Kollagen aus Rattenschwanzkollagen
- Implantation von Kollagen des Typ I

Histologisch ließ sich bei keinem der Kontrolltiere eine Knochenneubildung feststellen.

4.2.6 Explantate

4.2.6.1 Gewinnung der Explantate

Die Ratten werden mit Äther betäubt und durch eine intracardial verabreichte Überdosis von Nembutal getötet. Nach Anlegen eines medianen Bauchschnittes wird die Haut nach beiden Seiten hin abpräpariert. Das durch einen Mersilenfaden gekennzeichnete Implantatgebiet wird mit den angrenzenden Bauchwandteilen großzügig herausgeschnitten. Die am Implantationsort entstandenen Produkte werden herauspräpariert.

Explantate bei denen man eine Bestimmung der alkalischen Phosphatase vornimmt, gibt man in gekühlte Reagenzgläser

und führt unmittelbar danach die Messung der alkalischen Phosphatase durch (siehe 4.2.6.3).

Explantate, die für die histologische Auswertung vorgesehen sind, füllt man in ein Reagenzglas mit 40 % Alkohol.

4.2.6.2 Histologie

4.2.6.2.1 Fixieren und Einbetten

Die frischen Explantate werden wie bereits erwähnt zunächst in 40 % Alkohol gelegt.
Die weitere Fixierung führt man folgendermaßen durch :

- 2 x 2 Std. in 70 % Äthanol
- 2 x 1 Std. in 96 % Äthanol
- 3 x 1 Std. in 100 % Äthanol
- 3 x 1 Std. in Benzol

Voraussetzung für eine gute Paraffineinbettung ist die vollständige Entfernung des Alkohols. Daher wird zwischen die aufsteigende Alkoholreihe, die der Fixierung dient und der Paraffindurchtränkung ein "Intermedium" (hier Benzol) geschaltet.

Nachdem die Explantate 3 x 1 Std. in Benzol lagen, werden sie anschließend zuerst in eine Lösung aus Intermedium und weichem Paraffin und dann in mit Paraffin gesättigtes Benzol gebracht.
Nun gibt man die Proben in geschmolzenes warmes Paraffin bis das Gewebe ganz durchtränkt ist (genaue Zeit- und Wärmegradangaben siehe "Histologische Technik" Hans Christian Burck, 5. Auflage Thieme Taschenbuch S.54).

Die paraffindurchtränkten Explantate und flüssiges Paraffin werden in spezielle Einbettungsformen gebracht. Nachdem die Paraffinblöckchen abgekühlt sind, entfernt man diese aus der Form und beschriftet sie.

4.2.6.2.2 Herstellung von Dünnschnitten

Die im Eisschrank gekühlten Blöckchen werden ins Mikrotom

eingespannt und solange angeschnitten bis das Objekt mit einer ausreichend großen Fläche zu sehen ist.

Nun folgt die eigentliche Anfertigung der Schnitte. Man nimmt diese mit einem Pinsel oder einem Häkchen vom Messer, streckt sie in einem Wasserbad (40-45°C) und zieht sie anschließend auf die Objektträger auf.
Die Schnittstärke beträgt 5 µm.
Die Paraffinblöcke werden zwischendurch mit Eiswürfeln gekühlt.

Zur besseren Haftung an den Objektträgern werden die Schnitte bei 45°C auf dem Wärmetisch (Rand des Wasserbades) nachgetrocknet. Anschließend kommen sie 30 min. lang in einen Wärmeschrank mit 80°C. Bis zur Entparaffinierung mit Xylol werden die Objektträger bei 40°C aufbewahrt.

4.2.6.2.3 Ausbettung

Vor der Färbung muß das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst werden. Hierzu gibt man sie hintereinander 1 x 15 min. und 1 x 5 min. in Xylol.

Es folgt dann eine absteigende Alkoholreihe:
- 100 % Alkohol 2-3 min.
- 96 % Alkohol 2-3 min.
- 80 % Alkohol 2-3 min.
- 70 % Alkohol 2-3 min.

Nun können die Präparate gefärbt werden.

4.2.6.2.4 Färbeverfahren

Die Schnitte werden abwechselnd nach Masson-Goldner und van Kossa gefärbt.

Die Trichromfärbung nach Masson-Goldner wird folgendermaßen durchgeführt:

- Weigert's-Eisenhämatoxilin 3 min.
  (bestehend aus Lsg. A (1 g Hämatoxilin in 100 ml 96 % Alkohol) und Lsg. B (1,16 g FeCl, 98 ml aqua dest., 1 ml HCl))
- Fließwasser zum Bläuen 10 - 15 min.
- Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin 5 - 7 min.
- 1 % Essigsäure zum Abspülen
- Phosphormolybdänsäure-Orange G bis zur Entfärbung des Bindegewebes (einige Minuten)
- 1 % Essigsäure zum Spülen
- Lichtgrün 30 sec.
- 1 % Essigsäure zum Spülen
- rasch entwässern

Als Ergebnis dieser Färbung erhält man eine Braunschwarzfärbung der Zellkerne, eine grüne Farbe des Kollagens, der Knochengrundsubstanz, des nicht mineralisierten und mineralisierten Knorpels. Osteoid und Fibrinprodukte werden leuchtend rot. Muskelgewebe färbt sich blaßrot.
Der genaue Mechanismus der Färbung ist nicht bekannt.

Der Kalknachweis nach van Kossa wird wie folgt vorgenommen:

- Auswaschen der Schnitte mit aqua dest.
- 3 %ige $AgNO_3$-Lsg 30 min.
- 2 x Auswaschen mit aqua dest. 4-5 min.
- 5 %iges Natriumthiosulfat 1-2 min.
- 2 x Auswaschen mit aqua dest. 15 min.
- Gegenfärbung mit Toluidinblau 2-3 min. (auf einer Wärmeplatte)
- gründlich mit aqua dest. spülen

In dieser Färbung erscheinen mineralisierte Gewebe schwarz.

Eine Unterscheidung zwischen amorphem Calciumphosphat und Calciumapatit ist jedoch nicht möglich.

Die Gegenfärbung mit Toluidinblau erleichtert die Orientierung im Präparat. Es resultiert eine Blaufärbung des Schnittes, was die Strukturen hervorhebt.

In Anwesenheit von sauren Mukopolysacchariden (z.B. im Knorpelgewebe) tritt eine Metachromasie auf, d.h. die blaue Farbe schlägt ins Rötliche um.

Nach dem Färben werden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe und durch ein zweistufiges Xylolbad rasch entwässert und abschließend mit Deckgläsern und Depex eingedeckt.

4.2.6.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die gekühlten Proben werden mit einer Schere grob zerkleinert, damit sich beim anschließenden Homogenisieren keine langen, faserigen Strukturen um das Messer wickeln.

Jedes zerkleinerte Explantat wird mit einigen ml eines 0,1 N Tris-HCl-Puffers (pH 7,5) in einen speziellen Glaskolben eingefüllt und 5 Minuten bei 10000 UpM im Messerhomogenisator zu einer breiförmigen Masse verarbeitet. Der Glaskolben wird während dieses Vorgangs mit Eis und fließend kaltem Wasser gekühlt. Der Inhalt des Glaskolbens wird in ein Reagenzglas entleert, mit aqua dest. nachgespült und die Spülflüssigkeit zum Homogenisat hinzugegeben. Die Proben werden bei 3000 UpM und bei 4°C 5 min. lang zentrifugiert.

Aus dem klaren Überstand erfolgt dann nach der Methode von Bessey in der Modifikation von Walter und Schütt (1970) die Bestimmung der AP-Aktivität (Merckotest R "Alkalische Phosphatase"). Dabei werden zu 2,5 ml des Testansatzes 0,2 ml des zu messenden Zentrifugenüberstandes hinzupippetiert und bei folgenden Randbedingungen die Extinktion gemessen:

Schichtdicke 1 cm
Temperatur 25°C
Wellenlänge 405 nm.

Ein Potentiometerschreiber zeichnet bei einer Papiergeschwindigkeit von 30 mm/min. die Extinktionszunahme graphisch auf. Man erhält eine Gerade, deren Steigung der Extinktionszunahme pro Minute entspricht (E/min.).

Der Testansatz enthält folgende Bestandteile:

- 10 mmol / l p-Nitrophenylphosphat als Substrat
- 0,5 mmol / l Magnesiumchlorid
- 1,0 mol / l Diäthanolamin-HCl-Puffer pH 9,8 zur Konstanthaltung des pH-Optimums (Walter und Schütt, 1970)

Die Magnesiumionen aktivieren die alkalische Phosphatase (Schüssler, 1968).
Die AP spaltet p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol und Phosphat.

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} + H_2O \xrightarrow{AP} \text{p-Nitrophenol} + \text{Phosphat}$$

(Bessey et al., 1946).

Hierbei verschiebt sich das Extinktionsmaximum von 310 nm (p-Nitrophenylphosphat) zu 405 nm (p-Nitrophenol).
Nach dem Lambert-Beer-Bouguer'schen Gesetz entspricht die Extinktionszunahme Δ E/ min. bei 405 nm der Konzentrationszunahme an p-Nitrophenol, die bei vorliegender Substratsättigung der Enzymkonzentration proportional ist (Michaelisbeziehung).

Zur Berechnung der Volumenaktivität (U/ml) gilt folgendes (Beipackzettel zum Merckotest):

(1) $$\text{Aktivität} = \frac{V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta t \text{ U/ml Probenlsg.}$$

dabei ist :

$\Delta E / \Delta t$ = Extinktionsdifferenz/min.

V = Testvolumen in ml

ε = Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (als p-Nitrophenolat-Anion; 18,5 cm^2 / µMol bei 405 nm)

d = Schichtdicke in cm

v = Probevolumen in ml

daraus ergibt sich :

(2) Gesamtaktivität : U_{gesamt} = U / ml · ml (Gesamtvolumen)

(3) Aktivität pro Gramm Trockenimplantat:

$$U / g = \frac{U \text{ gesamt}}{g \text{ Implantatgewicht}}$$

Laut Definition entspricht ein Unit derjenigen Menge AP, die bei 37°C in einer Minute 1 µmol p-Nitrophenol freisetzt. Nach Gleichung 2 läßt sich aus der Volumenaktivität, die in jedem der Homogenisate (ml) absolut enthaltene Enzymmenge berechnen. Sie wird dann auf das Implantatgewicht bezogen.

Die auf das Implantatgewicht bezogene Aktivität erhält man aus Gleichung 3.

Der verbleibende Rest der Proben wird eingefroren.

5. Ergebnisse

5.1 Rückstand an Trifluoressigsäure in Sediment und Überstand nach Gefriertrocknung, Dialyse bzw. Entsalzung mittels Gelfiltration

Um den Rückstand an TFA im lyophilisierten Sediment und Überstand festzustellen, läßt man eine Fluorbestimmung in den Analytischen Laboratorien in Gummersbach durchführen. Aus Kostengründen erfolgt die Analyse nur am TFA-12 Std.-Rest und am TFA-12 Std.-Löslichen (siehe Tab. 1).

Der 48 Std. lyophilisierte TFA-12 Std.-Rest hat einen Fluorgehalt von 4,56%, was einem TFA-Gehalt von 9,02% entspricht. Das 48 Std. lang lyophilisierte TFA-12 Std.-Lösliche enthält 9,81% Fluor und einen entsprechenden TFA-Gehalt von 19,62%.

Durch weiteres 96-stündiges Lyophilisieren kann der Fluorgehalt im TFA-12 Std.-Löslichen nur um 2,2% von 9,81% auf 7,61% gesenkt werden.

Weitere 48 Std. Gefriertrocknung ergeben nur noch eine geringe Senkung um 0,18%.

Trifluoressigsäure ist eine flüchtige Säure und läßt sich durch Lyophilisieren entfernen. Da der Fluorgehalt in den untersuchten Proben selbst nach 192 Std. Gefriertrocknung noch hoch ist, muß angenommen werden, daß TFA als Salz vorliegt. Deshalb wird das TFA-12 Std.-Lösliche mittels Gelfiltration entsalzt. Es bleibt ein Fluorgehalt der kleiner als 0,05% ist.

Der TFA-12 Std.-Rest wird zur Entsalzung dialysiert. Auch hier ist der verbleibende Fluorgehalt mit 0,013% vernachlässigbar klein.

Verfahren	Material	Fluorgehalt	TFA-Gehalt
nach 48 Std. Lyophilisieren	TFA-12 Std.-Rest	4,56%	9,02%
nach 48 Std. Lyophilisieren	TFA-12 Std.-Löslich	9,81%	19,62%
nach 144 Std. Lyophilisieren	TFA-12 Std.-löslich	7,61%	15,22%
nach 192 Std. Lyophilisieren	TFA-12 Std.-Löslich	7,43%	14,86%
nach Entsalzung mittels Gelfiltration	TFA-12 Std.-Löslich	0,05%	0,1%
nach Dialysieren	TFA-12 Std.-Rest	0,013%	0,026%

Tab. 1: Fluor- und Trifluoressigsäuregehalt der Proben

5.2 Ergebnisse der Serie 1

Bei der Implantatserie 1 werden die TFA-löslichen und TFA-unlöslichen Knochenbestandteile nach 12, 24 und 36-stündiger Extraktion in die Muskulatur von Ratten implantiert.

Bei der Explantation von TFA-12 Std.-Löslich, TFA-24 Std.-Löslich und TFA-36 Std.-Löslich ist am Implantationsort makroskopisch keine Veränderung sichtbar, d.h. keine Knochenbildung und keine Bindegewebsvermehrung, so daß die Stelle, an der das Material implantiert wurde, nur am Faden, der zur Kennzeichnung des Implantationsortes angebracht wurde, erkannt werden kann. Es ist daher anzunehmen, daß das Implantationsmaterial in kürzester Zeit resorbiert wird.

Auf eine histologische Aufarbeitung wird verzichtet. Bei jeweils 6 Implantaten von TFA-12 Std.-Löslich und TFA-24 Std.-Löslich wird eine Bestimmung der alkalischen Phosphatase durchgeführt.

Der mittlere Wert der AP-Aktivität ergibt bei den TFA-12 Std.-Löslich Explantaten 2,35 U/g, wobei der niedrigste Wert bei 1,36 U/g und der höchste bei 3,96 U/g liegt (siehe Tab. 2).

Der Mittelwert bei den TFA-24 Std.-Löslich Explantaten beträgt 2,30 U/g, wobei der niedrigste Wert bei 1,70 U/g und der höchste bei 3,96 U/g liegt (siehe Tabelle 4).

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase bei den TFA-12 Std.-Rest Explantaten ergibt einen Mittelwert von 10,03 U/g. Der niedrigste Wert liegt bei 6,01 U/g, der höchste bei 14,25 U/g (siehe Tabelle 3).

Bei den TFA-24 Std.-Rest Explantaten ergibt die Bestimmung der alkalischen Phosphatase einen mittleren Wert von 10,63 U/g. Der niedrigste Wert liegt bei 6,98 U/g, der höchste bei 16,64 U/g (siehe Tabelle 5).

Die histologischen Präparate der Implantate von TFA-12 Std.-Rest, TFA-24 Std.-Rest und TFA-36 Std.-Rest zeigen nahezu unveränderte Implantatpartikel mit geringer bis reichlicher Bindegewebsneubildung zwischen den einzelnen Partikeln. In vielen Präparaten infiltrieren lymphozytäre und monozytäre Zellen die Implantatregion. Zum Teil liegt eine reichliche Bildung von extrazellulärer Matrix vor.
In keinem der Präparate kann eine Knorpel- oder Knochenneubildung festgestellt werden (Abb. 8-9).

TFA-12 Std.-Löslich Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,068	1,36
2	0,069	1,38
3	0,075	1,50
4	0,111	2,22
5	0,183	3,66
6	0,198	3,96
$\bar{x}$		2,35
$s^{\pm}$		1,18

Tab. 2: AP-Aktivität der TFA-12 Std.-Löslich Explantate

TFA-12 Std.-Löslich Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,601	6,01
2	0,622	6,22
3	0,807	8,07
4	1,250	12,50
5	1,312	13,12
6	1,425	14,25
$\bar{x}$		10,03
$s^{\pm}$		3,69

Tab. 3: AP-Aktivität der TFA-12 Std.-Rest Explantate

TFA-24 Std.-Löslich Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,085	1,70
2	0,087	1,74
3	0,091	1,82
4	0,107	2,14
5	0,153	3,06
6	0,168	3,36
$\bar{x}$		2,30
$s^{\pm}$		0,72

Tab. 4: AP-Aktivität der TFA-24 Std.-Löslich Explantate

TFA-24 Std.-Rest Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,698	6,98
2	0,742	7,42
3	0,907	9,07
4	1,098	10,98
5	1,270	12,70
6	1,664	16,64
$\bar{x}$		10,63
$s^{\pm}$		3,65

Tab. 5: AP-Aktivität der TFA-24 Std.-Rest Explantate

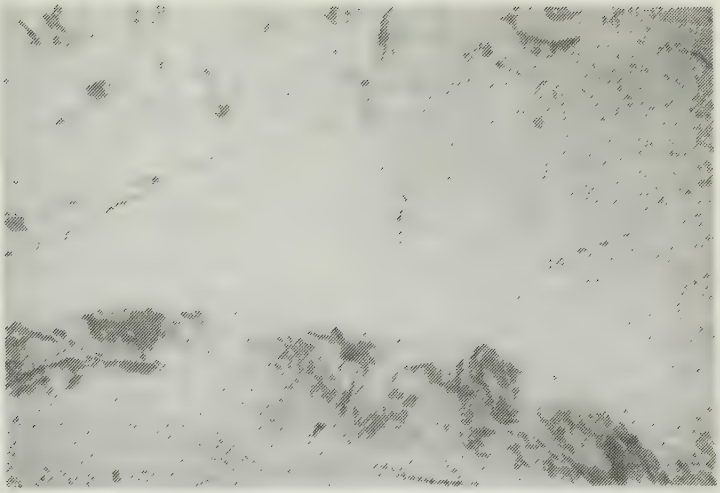


Abb. 8: Nahezu unveränderte Implantatpartikel mit lymphozytärer und monozytärer Zellinfiltration, Bildung extrazellulärer Matrix, Masson-Goldner-Färbung, TFA-12 Std. Rest, 16 Tage nach der Implantation

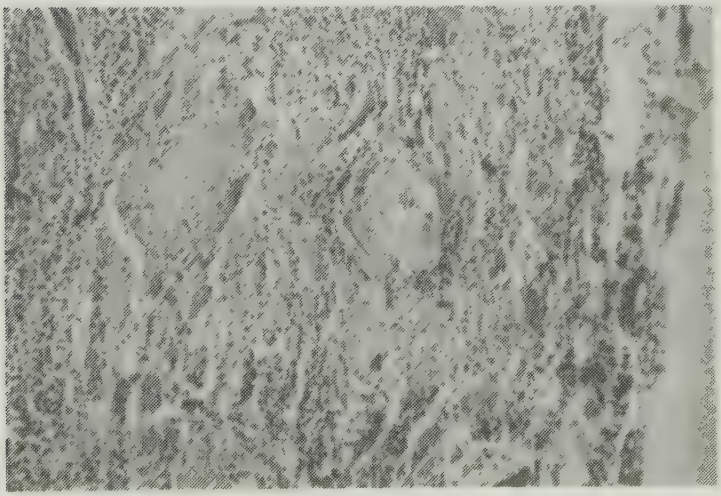


Abb. 9: In der Muskeltasche befindliche nicht resorbierte Implantatpartikel, in den Zwischenräumen geringe Bindegewebsneubildung, reichlich lymphozytäre und monozytäre Zellen, Masson-Goldner-Färbung, TFA-36 Std. Rest, 3 Wochen nach der Implantation

5.3 Ergebnisse der Serie 2

Serie 2 umfaßt die GuHCl-löslichen (P_3), GuHCl-unlöslichen (P_2) und die wasserlöslichen (S_2) Bestandteile der Schweineknochenmatrix.

5.3.1 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Es ergeben sich die in Tabelle 6-8 aufgelisteten Werte. Bei den Explantaten von P_3 liegt der Mittelwert bei 22,52 U/g, bei P_2 liegt er bei 5,26 U/g und bei den wasserlöslichen Bestandteilen bei 3,42 U/g.

5.3.2 Histologische Ergebnisse

Die osteogenetische Wirkung der GuHCl-löslichen Fraktion wird durch die histologische Auswertung der Explantate nochmals kontrolliert.
Von den 3 Explantaten sind 2 histologisch nachweisbar positiv. In der Muskeltasche ist neugebildetes chondroides Knochengewebe erkennbar. An der Grenze zur Muskulatur hin kann man eine mäßige Bindegewebsneubildung ohne entzündliche Infiltrate beobachten (Abb. 10). Bei stärkerer Vergrößerung zeigt sich chondroides Knochengewebe mit knorpelähnlichen Zellen, aber auch bereits metaplastische in Richtung Osteozyten veränderte Zellen (Abb. 11-12).

In den nach van Kossa gefärbten Präparaten sieht man deutlich die Mineralisation des chondroiden Knochens mit den typischen Höfen um die chondroiden Zellen (Abb. 13).

P_3-Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,256	5,12
2	0,83	16,60
3	0,901	18,02
4	1,279	25,58
5	1,302	26,04
6	2,189	43,78
$\bar{x}$		22,52
$s\pm$		12,90

Tab. 6: AP-Aktivität der P_3-Explantate

P_2-Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,224	4,48
2	0,249	4,98
3	0,253	5,06
4	0,268	5,36
5	0,321	6,42
$\bar{x}$		5,26
$s\pm$		0,72

Tab. 7: AP-Aktivität der P_2-Explantate

S_2-Explantate	U_{gesamt}	U/g
1	0,076	3,37
2	0,078	3,46
$\bar{x}$		3,42

Tab. 8: AP-Aktivität der S_2-Explantate

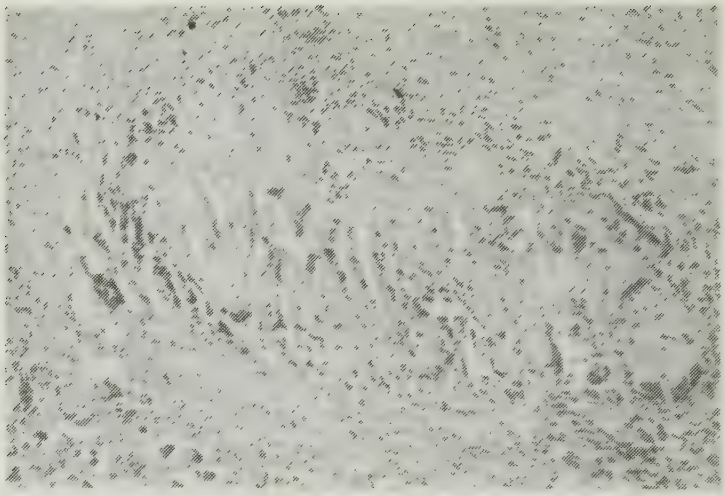


Abb. 10: Neugebildetes chondroides Knochengewebe, an der Grenze zur Muskulatur hin mäßige Bindegewebsneubildung ohne entzündliche Infiltration, Masson-Goldner-Färbung, 3 Wochen nach der Implantation

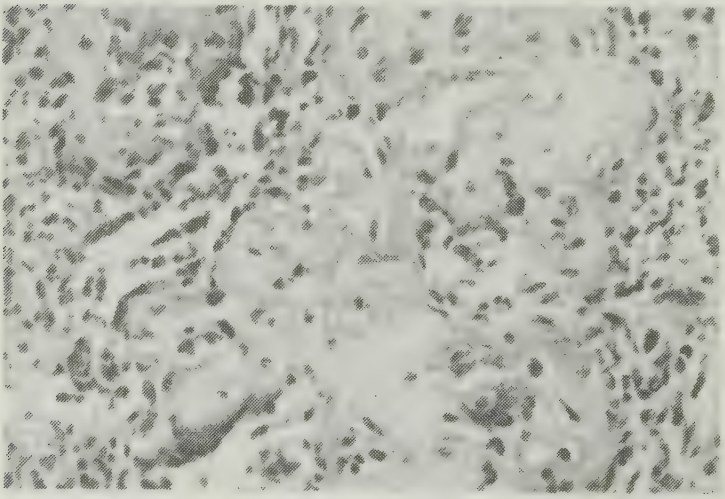


Abb. 11: Chondroides Knochengewebe mit knorpelähnlichen Zellen, aber auch bereits metaplastisch in Richtung Knochenzellen veränderte Zellen, Masson-Goldner-Färbung, 3 Wochen nach der Implantation

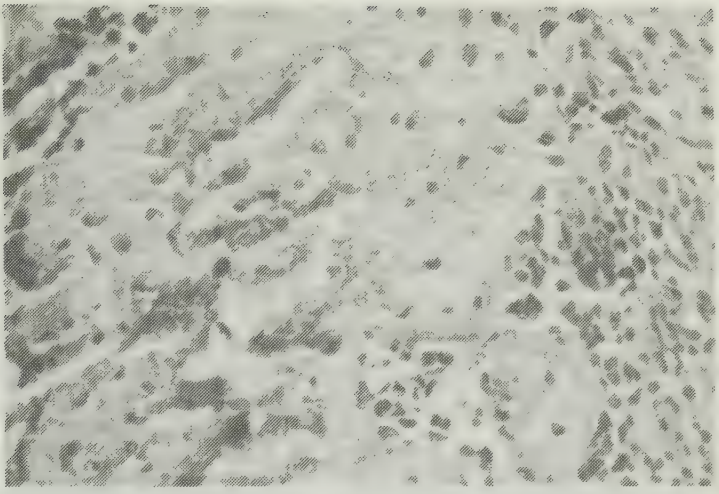


Abb. 12: siehe Beschreibung von Abb. 11

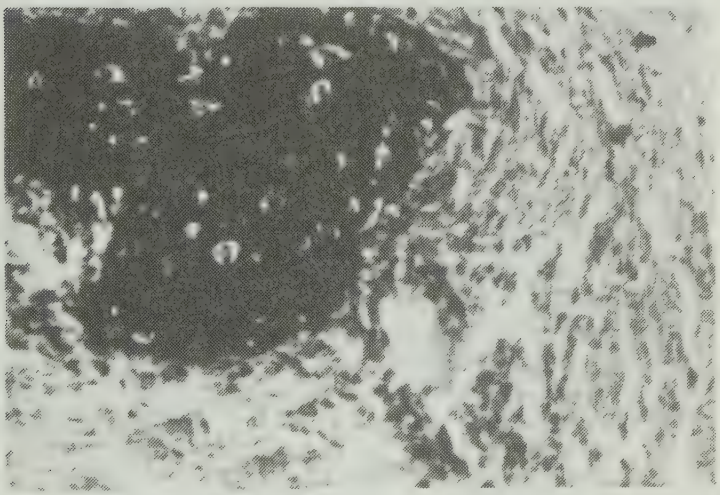


Abb. 13: Deutliche Mineralisation des chondroiden Knochens mit den typischen Aussparungen um die chondroiden Zellen, van Kossa-Färbung, 3 Wochen nach Implantation

5.4 Ergebnisse der Serie 3:

Serie 3 bezeichnet die GuHCl-löslichen Bestandteile der Rindermatrix. Die Explantate werden histologisch ausgewertet.

In keinem der Präparate ist eine Knorpel- oder Knochenbildung nachweisbar. Zwischen den noch nicht resorbierten Implantatpartikeln findet man eine ausgeprägte lymphozytäre und monozytäre Zellinfiltration mit reichlich vielkernigen Riesenzellen vom Typ der Fremdkörperriesenzellen. Die Implantatpartikel werden durch die Riesenzellen und die monozytären Zellen resorbiert (Abb. 14).

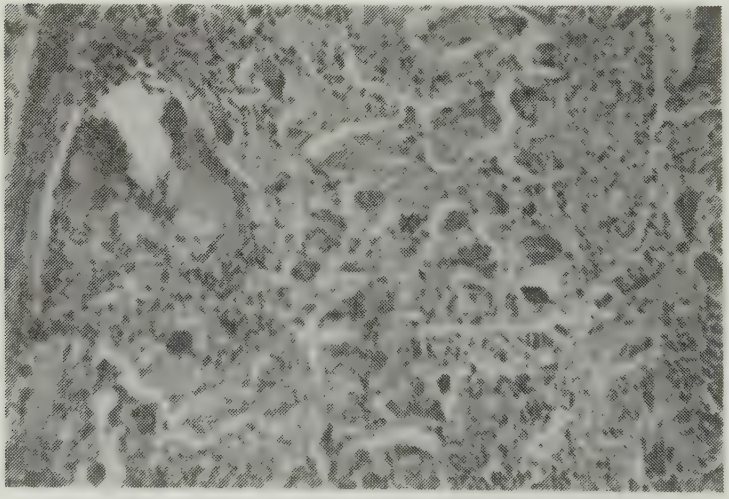


Abb. 14: Noch nicht resorbierte Implantatpartikel mit ausgeprägter lymphozytärer und monozytärer Zellinfiltration, reichlich vielkernige Riesenzellen vom Typ der Fremdkörperriesenzellen(x), Masson-Goldner-Färbung, 3 Wochen nach der Implantation

5.5 Ergebnisse der Serie 4

Serie 4 beinhaltet die Fraktionen des 4 molaren GuHCl-Extraktes nach CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Die Auswertung erfolgt histologisch.

Bei Versuch 1 ist das Implantat der Fraktion 1-D wie erwartet negativ. Es ist lediglich eine geringe Bindegewebsneubildung mit vereinzelt Lymphozyten erkennbar.

Eines der beiden Implantate der Fraktion 2-D ist positiv. Im Zentrum der Implantatregion ist neugebildetes chondroides Knochengewebe mit Bindegewebsbildung zur Muskulatur hin nachweisbar. In diesem Bindegewebe sind vereinzelt Lymphozyten zu finden. Die umgebende Muskulatur ist nicht verändert (Abb. 15).

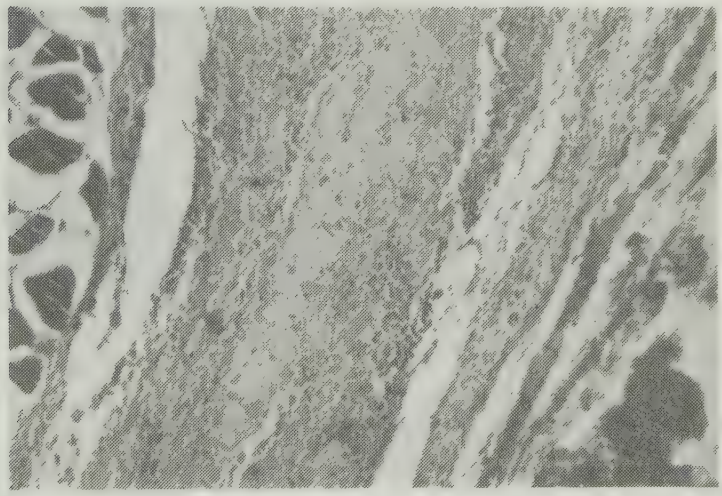


Abb. 15: Neugebildetes chondroides Knochengewebe mit Bindegewebsneubildung zur Muskulatur hin, vereinzelt Lymphozyten, Masson-Goldner-Färbung, 15 Tage nach der Implantation

Von den 2 Präparaten der Fraktion 3-D ist ebenfalls eines positiv. Der histologische Befund entspricht dem des positiven Fr. 2-D Implantates (Abb. 16).

Beim Implantat der Fraktion 4-D kann keine Knorpel- oder Knochenbildung festgestellt werden.
Das histologische Bild entspricht dem der Fraktion 1-D.

Im 2. Versuch sind die 2 Implantate der Fraktion 1-A histologisch negativ. Es finden sich in der Muskeltasche keine Zeichen einer Knorpel- oder Knochenneubildung.

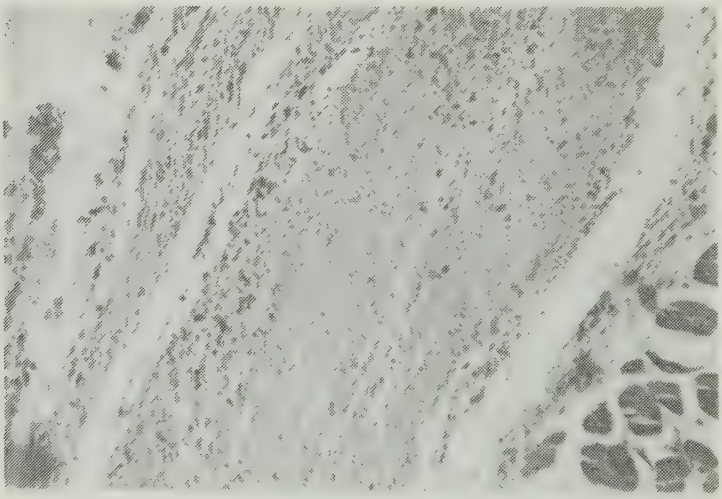


Abb. 16 : siehe Beschreibung von Abb. 15

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden als Indikatoren der Chondro- bzw. der Osteogenese die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase und der histologische Nachweis herangezogen.

Die Bestimmung der AP-Aktivität läßt sich methodisch einfach durchführen und gilt als zuverlässiges Zeichen für eine erfolgte Knochenneubildung (Reddi und Huggins, 1972; Firschein und Urist, 1971 und 1972), obwohl die genaue Funktion des Enzyms bei der Osteogenese noch nicht bekannt ist (Shapiro, 1981).

Als Versuchsdauer für die Messung der alkalischen Phosphatase wurde ein Zeitraum von 10 Tagen gewählt.
Während Firschein und Urist über ein Enzymmaximum am 20. Tag berichteten, erhielten Reddi und Huggins die höchsten Werte bereits am 10. Tag.

Der wichtigste Parameter für eine erfolgte Osteoinduktion allerdings ist die morphologische Feststellung einer Knorpel- oder Knochenneubildung.

Da es sich bei der Erforschung der induzierten Osteogenese gezeigt hatte, daß das Kollagen der Matrix keine bedeutende Rolle spielt, versuchte man es zu entfernen.
Dies ist sowohl durch die Anwendung des Enzyms Kollagenase (Thielemann, 1985) als auch durch die Extraktion mit Trichloressigsäure möglich. Trichloressigsäure (TCA) bewirkt durch eine milde Hydrolyse die Entfernung des Kollagens.

Thielemann (unveröffentlichte Befunde) konnte mit TCA behandelten kollagenfreien Matrixderivaten eine rasch ablaufende endesmale Osteogenese nachweisen. Bei diesem Extraktionsverfahren mußte die Trichloressigsäure vor der Implantation mittels Soxhlettierens aus den kollagenfreien Matrixresten entfernt werden. Um dieses aufwendige Verfahren zu umgehen, wurde in dieser Arbeit der Versuch gemacht, die Extraktion mit der flüchtigen Trifluoressigsäure (TFA) durchzuführen.

Man hoffte die TFA durch genügend langes Lyophilisieren entfernen zu können. Die Analysen ergaben jedoch, daß der 48 Stunden lyophilisierte TFA-12 Std.-Rest einen TFA-Gehalt von 9,02% und das TFA-12 Std.-Lösliche einen TFA-Gehalt von 19,62% hatte. Nach insgesamt 144 Stunden Gefriertrocknung lag der TFA-Gehalt des 12 Std.-Löslichen um 4,4% niedriger. Weitere 48 Stunden Lyophilisieren erbrachten nur noch eine Abnahme von 0,36%.

Da der TFA-Gehalt sich mittels Gefriertrocknung nicht befriedigend senken ließ, mußte vor der Implantation des Materials das verbliebene Extraktionsmittel durch Dialyse des Restes und Gelfiltration des Löslichen entfernt werden.

Bei der Testung der TFA behandelten Matrix trat keine Knochenbildung auf. In der Histologie zeigten sich in den Muskeltaschen die noch nahezu unveränderten Implantatpartikel mit geringer bis reichlicher Bindegewebsneubildung. In vielen Präparaten infiltierten reichlich lymphozytäre und monozytäre Zellen die Implantatregion.

Trotz negativer Histologie lag die AP-Aktivität nach 10 Tagen beim TFA-12 Std.-Rest bei 10,03 U/g, beim TFA-24 Std.-Rest bei 10,63 U/g.

Im Vergleich dazu konnte Thielemann nach Extraktion der Schweinematrix mit Trichloressigsäure mit dem kollagenfreien Rest eine rasch ablaufende endesmale Osteogenese induzieren. In den meisten Explantaten hatte sich ein zentraler, flüssigkeitsgefüllter zystischer Hohlraum gebildet. Bereits nach 5 Tagen zeigten sich in der histologischen Untersuchung in der Zystenwand Bezirke mit mineralisierten Knochentrabekeln. Zeichen einer Knorpelbildung als Zwischenstufe waren nicht nachweisbar.
Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase ergab nach 10 Tagen einen Enzymgehalt von 20,5 U/g.

Eine geringgradige Erhöhung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase kann durch eine immunologische Abwehrreaktion im Implantationsbereich verursacht sein.

Die hohen Werte bei der TFA-Extraktion können jedoch nicht nur auf eine immunologisch bedingte Entzündung zurückgeführt werden. Die Ursache hierfür wurde nicht näher untersucht, da alle histologischen Präparate negativ waren.

Die AP-Werte des TFA-12 Std.-Löslichen und des TFA-24 Std.-Löslichen waren mit Werten von 2,51 und 2,304 U/g nur leicht erhöht. Eine Bildung von Knorpel- oder Knochengewebe kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Die durchgeführten Versuche zeigen, daß mit TFA behandelte Matrix im Gegensatz zu TCA behandelter Matrix keine osteoinduktive Eigenschaft mehr besitzt. Es muß daher angenommen werden, daß die Trifluoressigsäure zu einer Auslöschung oder zumindest zu einer starken Minderung der osteoinduktiven Aktivität führt. Allerdings könnte die Dialyse ein mögliches Störfeld im Versuchsablauf darstellen. Der verwendete Dialyseschlauch besitzt eine Ausschlußgrenze von etwa 10000 Daltons. Moleküle mit einem größeren Molekulargewicht können die Membran nicht diffundieren. Die Möglichkeit der Diffusion ist jedoch auch von der Ladung und Form der Teilchen abhängig, so daß sich dieser Wert erheblich verändern kann.

Die Möglichkeit, daß das Osteogenin bei der Extraktion mit Trifluoressigsäure in einer wirksamen Form in Lösung geht, wurde durch den geringen Anstieg der AP nach Implantation von TFA-Löslichem weitgehend ausgeschlossen.

Sampath und Reddi (1981) stellten fest, daß die Extraktion der Knochenmatrix mit 4M GuHCl-Lösung zu einem Verlust der osteoinduktiven Aktivität führt. Durch Rekonstruktion von in 4M GuHCl gelöstem BMP mit dem Extraktionsrest ließ sich die knocheninduzierende Fähigkeit wiederherstellen.

Takaoka et al. (1980) und Hanamura et al. (1980) hingegen benutzten 4M GuHCl-Lösung, um die knocheninduzierende

Substanz aus Mäuseosteosarkomen herauszulösen.

Guanidiniumchlorid extrahiert Proteoglycane, Glykoproteine und andere Proteine aus dem Gewebe ohne irreversible Denaturierung. Es zerstört keine kovalenten Bindungen und schädigt das Bindegewebsstroma auch in hoher Konzentration nicht (Sadjera und Hascall, 1968; Tanfold, 1968).

BMP ist besser durch Guanidiniumchlorid oder ein Gemisch aus Calciumchlorid und Urea zu extrahieren, als durch andere Lösungsmittel (Urist et al., 1983).

Hanamura erhielt nach GuHCl-Extraktion von Osteosarkomgewebe oder Rattenknochen drei Fraktionen: die GuHCl lösliche Fraktion, die wasserlösliche Fraktion und die GuHCl unlösliche Restmatrix.

Hohe BMP-Aktivität erhielt er in der GuHCl löslichen Fraktion, gar keine in der wasserlöslichen Fraktion. Nur eine geringe osteoinduktive Eigenschaft konnte er beim Matrixrest verzeichnen. Jedes zweite Implantat zeigte eine geringe Knochenablagerung.

In den vorliegenden Versuchen wurde die GuHCl-Extraktion mit Schweineknochen durchgeführt. Es konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Die GuHCl lösliche Fraktion zeigte bei der Messung der AP-Enzymaktivität Werte bis 43,78 U/g. In der Histologie war neugebildetes chondroides Knochengewebe mit knorpelähnlichen Zellen, aber auch bereits metaplastisch in Richtung Osteocyten veränderten Zellen, erkennbar. Die Explantate der wasserlöslichen Fraktion ergaben nur leicht erhöhte Enzymwerte. Im Vergleich zu den positiven AP-Werten der GuHCl löslichen Fraktion kann davon ausgegangen werden, daß die wasserlösliche Fraktion wie bei Hanamura nicht osteoinduktiv wirksam ist.

Mizutani und Urist (1982), die die GuHCl-Extraktion an Rinderknochen durchführten, konnten nach der Implantation

der wasserlöslichen Fraktion ebenfalls keine Chondro- oder Osteogenese feststellen.

Die GuHCl unlösliche Restmatrix, die bei Hanamura et al. nur geringgradig positiv war, zeigte in den vorliegenden Versuchen mit Schweineknochen eine Erhöhung der AP-Aktivität bis zu 6,42 U/g. Diese erhöhten Werte korrelieren mit den in der Histologie spärlich sichtbaren Knochenablagerungen, die Hanamura et al. beobachten konnten. Letztlich beweisend wäre allerdings eine histologische Untersuchung, die jedoch nicht durchgeführt wurde.

Nach Implantation GuHCl unlöslicher Rindermatrix erhielten Mizutani und Urist wie auch Hanamura und seine Kollegen nur ganz wenig oder röntgenologisch gar nicht nachweisbare Knochenablagerungen.

Im Gegensatz zur GuHCl löslichen Fraktion der Schweinematrix konnte nach Implantation der entsprechenden Rinderknochenfraktion in den hier durchgeführten Versuchen keine osteoinduktive Aktivität festgestellt werden. Das Ausbleiben der Osteoinduktion ist wahrscheinlich durch die histologisch sichtbare persistierende Entzündung verursacht, die bei der GuHCl löslichen Schweinematrix nicht zu sehen war. Es bleibt allerdings ungeklärt, warum nach Implantation von Rindermaterial eine starke Entzündung entstand, wohingegen in den histologischen Präparaten der löslichen Schweineknochenfraktion diese nicht zu beobachten war.

Eine Extraktion mit Guanidiniumchlorid führten auch Thielemann et al. (1982) durch. Sie behandelten Knochengelatine (OCG=Osteogenin-containing gelatine) mit 4M GuHCl-Lösung. Bei der Testung konnten sie aber weder beim GuHCl behandelten OCG-Rest noch beim GuHCl löslichen Teil eine biologische Aktivität feststellen.

Um BMP aus dem GuHCl löslichen Osteosarkomgewebe zu isolieren, führten Hanamura und seine Mitarbeiter eine Cäsiumchlorid-Dichte-Gradienten-Zentrifugation unter dissoziativen und assoziativen Bedingungen durch.

Unter dissoziativen Bedingungen sind BMP und eine große Anzahl nichtkollagener Proteine gelöst im Extrakt. Unter assoziativen Bedingungen fallen einige Proteine mit niedrigem Molekulargewicht und eine BMP-Fraktion wieder aus, während Proteine mit hohem Molekulargewicht in Lösung bleiben (Mizutani und Urist, 1982).

In der mit Schweineknochen unter dissoziativen Bedingungen durchgeführten CsCl-Dichte-Gradienten Zentrifugation konnte entsprechend dem Versuchsergebnis von Hanamura nach der Implantation der Fraktion 1-D keine Knochenbildung festgestellt werden. Das Ergebnis einer Probe läßt jedoch keine generelle Aussage darüber zu, ob in der entsprechenden Fraktion BMP Aktivität enthalten ist.

In den Fraktionen 2-D und 3-D war nur jeweils ein Präparat positiv, während Hanamura bei allen seinen Präparaten der beiden Fraktionen eine Osteoinduktion verzeichnen konnte.

Die Ausbeute der 4. dissoziativen Fraktion war wie bei der Fraktion 1-D so gering, daß das Material nur für ein Implantat reichte. Dieses war negativ. Hanamura konnte bei 1/3 seiner Proben eine Knochenbildung beobachten.

Bei der Extraktion von Knochen mit GuHCl sind 94 % der Matrix unlöslich, wohingegen beim Osteosarkom nur 62 % als Rest zurückbleiben (Hanamura et al., 1980). Somit ist nach Auftrennung des Osteosarkomextraktes mittels CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation eine größere Ausbeute an Implantatmaterial zu erwarten. Zudem ist BMP im Osteosarkomgewebe in sehr viel höherer Konzentration vorhanden als in der Knochenmatrix, so daß eine kleinere Menge zur Osteoinduktion genügt.

Im Vergleich zu Rattenknochen enthält das Osteosarkom mehr BMP-Aktivität als aus dem ganzen Skelett von über 100 Ratten extrahiert werden kann (Urist et al., 1983).

Bei der assoziativen CsCl-Dichte-Gradienten Zentrifugation kam es zu einer Ansammlung des größten Teils des Extraktes in der obersten Fraktion 1-A. Die Ausbeute der anderen Fraktionen 2-A, 3-A und 4-A ergab deshalb insgesamt nur einige Milligramm, so daß eine Implantation nicht sinnvoll erschien. Die Testung der Fraktion 1-A zeigte ein histologisch negatives Bild.

Im Vergleich dazu konnte Hanamura bei jedem seiner sechs Implantate der Fraktion 1-A eine Osteoinduktion beobachten. Die anderen Fraktionen waren bei ihm negativ, so daß er von einer Konzentration von BMP in der obersten Fraktion ausging. Es bleibt noch zu klären, ob BMP nur wegen seiner Dichte, oder weil es an ein anderes Protein gebunden ist, unter assoziativen Bedingungen in die oberflächliche Fraktion wandert (Hanamura et al., 1980).

Um noch eine weitere Auftrennung der Substanzen der Fraktion 1-A zu erlangen, löste er diese in 4M GuHCl und führte anschließend eine dissoziative CcCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation durch. Diesesmal war die oberste Fraktion osteogenetisch unwirksam, während die darunter liegenden drei Fraktionen eine BMP-Aktivität aufwiesen.
Bei Anwendung zuerst der assoziativen Dichte-Gradienten-Zentrifugation und dann der dissoziativen Dichte-Gradienten-Zentrifugation kann eine Reinigung des BMP von fast 90% der nichtinduktiven Substanzen erreicht werden.

Mit dem Ziel das Molekulargewicht und die Struktur des "bone morphogenetic protein" aufzudecken, kann das osteogeninhaltige Material nach der Dichte-Gradienten-Zentrifugation mittels verschiedener Verfahren weiter gereinigt, angereichert und analysiert werden (Hanamura et al., 1980).

Gelänge die chemische Aufschlüsselung, Isolierung und Anreicherung von BMP so hätte dies einen breiteren Einsatz in der Klinik zur Folge.

Großen Nutzen errechnet man sich auch bei der Erforschung der Zelldifferenzierung (Urist et al., 1979).

7. Zusammenfassung

Thielemann erzielte nach Implantation von TCA behandelter Matrix eine Osteogenese. In der vorliegenden Arbeit wurde die Extraktion mit Trifluoressigsäure durchgeführt.
Es konnte aber weder bei der Restmatrix noch beim Extrakt eine osteogenetische Wirkung festgestellt werden.
Daher muß angenommen werden, daß die Trifluoressigsäure im Gegensatz zur Trichloressigsäure zu einer Auslöschung oder zumindest zu einer starken Herabsetzung der osteoinduktive Aktivität führt.

Die Extraktion von Schweinematrix mit GuHCl ergab eine hohe induktive Aktivität beim GuHCl-Löslichen, geringe Aktivität beim unlöslichen Rest und gar keine bei den wasserlöslichen Matrixbestandteilen.
Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Hanamura und seinen Mitarbeitern, die die Extraktion mit allogenem Rattenknochen und Osteosarkomgewebe durchführten.

Die implantierte GuHCl lösliche Rindermatrix löste eine starke Entzündungsreaktion aus. Eine Osteoinduktion konnte im Gegensatz zur Schweinematrix in keinem der Präparate beobachtet werden.

Zur teilweisen Reinigung des BMP wurde die CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation herangezogen. Bei einigen Fraktionen war die Ausbeute jedoch sehr gering.
Im Rahmen der dissoziativen Dichte-Gradienten-Zentrifugation wiesen die Fraktionen 2-D und 3-D eine osteoinduktive Wirkung auf. Die Fraktionen 1-D und 4-D waren negativ.

Bei der assoziativen Dichte-Gradienten-Zentrifugation kam es zu einer Ansammlung der größten Menge des gelösten Materials in der obersten Fraktion. Eine Knochenbildung konnte aber nicht ausgelöst werden. Das Lyophilisat der Fraktionen 2-A, 3-A und 4-A war für eine Implantation zu gering.

8. Literaturverzeichnis

Abdin, M., and Friedenstein A.Y.: Electron microscopic study of bone induction by the transitional epithelium of the bladder in guinea pigs
Clin. Orthop. 82, 182-194 (1972)

Amitani, K. and Nakata, Y.: Studies on a factor responsible for new bone formation from osteosarcoma in mice
Calc. Tiss. Res. 17, 139-150 (1975)

Amitani, K.; Nakata, Y and Stevens, J.: Bone induction by lyophilized osteosarcoma in mice
Calc. Tiss. Res. 16, 305-313 (1974)

Anastassiades, T.; Puzic, O. and Puzic, R.: Effect of solubilized bone matrix components on cultured fibroblasts derived from neonatal rat tissues
Calc. Tiss. Res. 26, 173-179 (1978)

Anderson, H.C. and Coulter, P.R.: Bone formation induced in mouse thigh by cultured human cells
J. Cell Biol. 33, 165-177 (1967)

Annersten, S.: Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Frakturkallus
Acta chir. scand. 84, Suppl. 60, 1-181 (1940)

Ash, P.; Loutit, J.F. and Townsend, K.M.S.: Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells
Nature 283, 669-670

Bang, G.: Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of dentin matrix
J. oral path. 1, 172-185 (1972)

Bang, G.; Nordenram, A. and Annerroth, G.: Allogenic demineralized dentin implants in jaw defects of java monkeys
Int. Oral Surg. 1, 126 (1972)

Baschkirzew, N.J. und Petrow, N.N.: Beiträge zur freien Knochenüberpflanzung
Dt. Zeitschr. f. Chir. 113, 490-531 (1912)

Basset, C.A.L.: Environmental and cellular factors regulating osteogenesis
In: Frost, H. (ed.): Bone biodynamics.
Boston, Little (1964)

Becker, R.O.: Electrical osteogenesis - pro and con.
Calc. Tiss. Res. 26, 93-97 (1978)

Bertelsen, A.: Experimental investigations into postfoetal osteogenesis
Acta orthop. scand. 15, 139-181 (1944)

Bessey, O.A.; Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum
J. Biol. Chem. 164, 321-329 (1946)

Blum, G.: Phosphatase and the repair of fractures
The Lancet II, 75-78 (1944)

Bourne, G.H.: The biochemistry and physiology of bone
2-nd ed. New York: Academic press 1972, Vol. 1

Brooks, D.B.; Heiple, K.G.; Herndon, C.H. and Powell, A.E.: Immunological factors in homogenous bone transplantation
J. Bone Jt. Surg. 45-A, 1617-1626 (1963)

Burger, E.H.; Meer van der, J.W.M.; Gevel van de, J.S.; Gribnau, J.C.; Thesingh, C.W. and Furth van, R: Origin of osteoclasts from immature mononuclear phagocytes
in: Silbermann, M.and Slavkin, H.C. (eds.) Current advances in skeletogenesis
Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford - Princetown 87-92 (1982)

Buring, K.: On the origin of cells in heterotopic bone formation
Clin. Orthop. 110, 293-302 (1975)

Buring, K. and Semb, H.: Enzyme patterns during bone induction
Calc. Tiss. Res. 4, (Suppl.), 102-104 (1970)

Butler, W.T.; Mikulski, A. and Urist, M.R.: Non-collagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity
J. dent. Res. 56 , 228-232 (1977)

Canalis, E.; Peck, W.A. and Raisz, L.G.: Stimulation of DNA and Collagen Synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria
Science 210, 1021-1023 (1980)

Chalmers, J.: Transplantation immunity in bone homografting
J. Bone Jt. Surg. 41-B,160-179 (1959)

Chalmers, J.; Gray, D.H. and Rush, J.: Observations on the induction of bone in soft tissues
J. Bone Jt. Surg. 57-B, 36-45 (1975)

Cline, M.J.: The White Cell
Cambridge, Haward University Press (1975)

Connor, J.M.: Soft Tissue Ossification
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo (1983)

Craig, L.C. and Königsberg, W.M.: Modification of pore size and shape in cellophane membranes
J. Phys. Chem. 65, 166-172 (1961)

Crelin, E.S. and Koch: An autoradiographic study of chondrocyte transformation into chondroclasts and osteocytes during bone formation in vitro
Anat. Rec. 158, 473-484 (1967)

Dietrich, J.W.; Goodson J.M. and Raisz L.G.: Stimulation of bone resorption by varius prostaglandins in organ culture
In: Prostaglandins August 1975, Vol. 10, No 2

Dunham, J.; Catterall, A.; Bitensky, L. and Chayen, J.: Metabolic changes in the cells of the callus during fracture healing in the rat
Calc. Tissue Int. 35, 56-61 (1983)

Elves, M.W. and Salama, R.: A study of the development of cytotoxic antibodies produced in recipients of xenografts of iliac bone
J. Bone Jt. Surg. 56-B, 331-339 (1974)

Fasol, P. und Galle P.: Spätergebnisse nach Implantation heterologen Knochenmaterials
Chir. Praxis 17, 587-591 (1973)

Firschein, H.E. and Urist, M.R.: The induction of alkaline phosphatase by extraskeletal implants of bone matrix
Calc. Tiss. Res. 7, 108-113 (1971)

Firschein, H.E. and Urist, M.R.: Enzyme induction, accumulation of collagen and calcification in implants of bone matrix
Clin. Orthop. 84, 263-274 (1972)

Fleisch, H.: Physiologie und Biochemie der Knochenbildung
Klin. Wschr. 1966, 360-363

Friedenstein, A.J.: Humoral nature of osteogenic activity of transitional epithelium
Nature 194, 698-699 (1962)

Friedenstein, A.J.: Induction of bone tissue by transitional epithelium
Clin. Orthop. 59, 21-37 (1968)

Friedenstein, A.J.: Determined and inducible osteogenic precursor cells, Hard Tissue Growth, Repair and Remineralisation
Ciba Foundation Symposium 11. New York, Elsevier 1973, 169-181

Friedenstein, A.J.: Precursor cells of mechanocytes
Int. Rev. Cytol. 47, 327-355 (1976)

Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K. and Lalykina, K.S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells
Cell Tiss. Kinet. 3, 393-401 (1970)

Friedenstein, A.J. and Lalykina, K.S.: Thymus cells are inducible to osteogenesis
Eur. J. Immunol. 2, 602-603 (1972)

Furth, van R.; Cohn, Z.A.; Hirsch, J.G.; Humphrey J.H.; Spector, W. and Langevoort, H.C.: The mononuclear phagocyte system: a new classification
Bull. WHO 46, 845-852 (1972)

Glucksmann, A.: The role of mechanical stresses in bone formation in vitro
J. Anat. 76, 231-329 (1942)

Goethlin, G. and Ericsson J.L.E.: The osteoclast: review of ultrastructure, origin and structure-function relationship
Clin. Orthop. Rel. Res. 120, 201-228 (1976)

Goldhaber, P.: Osteogenic induction across millipore filters in vivo
Science 133, 2065-2067 (1961)

Goodson, J.M.; Mc Clatchy, K. and Revell, C.: Prostaglandin induced resorption of the adult rat calvarium
J. Dent. Res. 53, 670 (1974)

Gould, T.R.L.; Westburg, L. and Tillmann, J.: Dentin matrix gelatine (DMG) as a possible "universal" grafting material in peridontics
J. Peridontal Jan. 1982, Vol, 53 No 1

Hall, B.K.: Tissue interactions and the initiation of osteogenesis and chondrogenesis in the neural crest-derived mandibular skeleton of the embryonic mouse as seen in isolated murine tissue and in recombinations of murine and avian tissues
J. Embryol. exp. Morph. 58, 251-264 (1980)

Hanamura, H. and Urist, M.R.: Osteogenesis and chondrogenesis in transplants of Dunn and Ridgeway osteosarcoma cell cultures
Am. J. Pathol. 91, 277-298 (1978)

Hanamura, H.; Higuchi, Y.; Nakagawa, M.; Iwata, H.; Nogami, H. and Urist, M.R.: Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix
Clin. Orthop. Rel. Res. 148, 281-290 (1980)

Hancox, N.M. and Wlodarski, K.: The role of host site in bone induction by transplanted xenogenic epithelial cells
Calc. Tiss. Res. 8, 258-261 (1972)

Heinen, J.H.; Dabbs, G.H. and Mason, H.A.: The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscle of rabbits
J. Bone Jt. Surg. 31-A, 765-775 (1949)

Heiple, K.G.; Herndon, C.H.; Chase, H.A. and Wattleworth, A.: Osteogenic induction by osteosarcoma and normal bone in mice
J. Bone Jt. Surg. 50-A, 311-325 (1968)

Holtrop, M.E.: The potencies of epiphyseal cartilage in enchondral ossification
Proc. k. Ned. Akad. Wet. Ser. C. 70, 21-28 (1967)

Huggins, C.B.: The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract.
Arch. Surg. 22, 377-408 (1931)

Huggins, C.B. and Sammet, J.F.: Function of the gall bladder epithelium as an osteogenic stimulus and the physiological differentiation of connective tissue
J. Exp. Med. 58, 393-400 (1933)

Huggins, C.B.; Mc Caroll, H.R. and Blocksom, B.H.: Experiments on the theory of osteogenesis
Arch. Surg. 32, 915-931 (1936)

Huggins, C.B.; Wiseman, S. and Reddi, A.H.: Transformation of fibroblasts by allogenic and xenogenic transplants of demineralized tooth and bone
J. Exp. Med. 132, 1250-1258 (1970)

Inoue, T.; Sasaki, A.; Shimono, M.and Yamamura, T.: Bone morphogenesis induced by implantation of dentin and cortical bone matrices
Bull. Tokyo dent. Coll. 22-4, 213-221 (1981)

Iwata, H. and Urist, M.R.: Protein polysaccharide of bone morphogenetic matrix
Clin. Orthop. 87, 257-274 (1972)

Jonck, L.M. and Eriksson, C.; Some factors affecting bone formation
S. Afr. med. J. 49, 1747-1753 (1975)

Joseliani, D.G.: The use of tritiated thymidine in the study of bone induction by transitional epithelium
Clin. Orthop. 88, 183-196 (1972)

Klein, D.C. and Raisz, L.G.: Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture
Endocrinology 86, 1436 (1970)

Lacroix, P.: Recent investigations on the growth of bone
Nature 156, 576 (1945)

Lacroix, P.: Organizers and the growth of bone
J. Bone Jt. Surg. 29, 292.296 (1947)

Leaver, A.G.; Holbrook, J.B.; Jones J.L.; Sheil, M.T. and Sheil, L.: Components of the organic matrices of bone and dentin isolated only after digestion with collagenase
Arch. Oral Biol. 20, 211-216 (1975)

Lerich, R. et Policard, A.: Les problèmes de la physiologie normale et pathologique de l'os
Paris, Masson (1926)

Levander, G.: A study of bone regeneration
Surg. Gynecol. Obstet. 67, 705-714 (1938)

Linden, G.J.: Bone induction in implants of decalcified bone and dentine
J. Anat. 119, 359-367 (1975)

Luostarinen, V. and Rönning, O.: Differences in the osteoinductive potential of transplanted isogeneic dental structures of the rat
Acta anat. 99, 76-83 (1977)

Martin, B.: Über die osteogenetische Fähigkeit des Periostes
Arch. f. klin. Chir. 144 489-530 (1927)

Minkin, C.; Zussman, K.D.; Pokres, S. and Singer, F.R.: Local mechanisms of bone resorption: paracrine agents influencing macrophage involvement in bone resorption
in : Silbermann, M.; Slavkin, H.C. (eds.): Current advances in skeletogenesis
Excerpta Medica Amsterdam - Oxford - Princetown 1982

Mizutani, H. and Urist, M.R.: The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatine
Clin. Orthop. Rel. Res. 171, 213-223 (1982)

Neuhof, H.: Fascia transplantation into visceral defects: An experimental and clinical study
Surg. Gynecol. Obstet. 24, 383-427 (1917)

Orell, S.: Studien über Knochenimplantation und Knochenneubildung, Implantation von "Os Purum" sowie Transplantation von "Os Novum"
Acta Chir. Scand. 74, Supplement 31 (1934)

Osbody Ph. and Caplan, A.I.: Characterisation of bone-specific alkaline phosphatase in chick limb mesenchymal cell cultures
Dev. Biol. 86, 136-146 (1981)

Owen, M.: The origin of bone cells
Int. Rev. Cytol. 28, 213-238 (1970)

Owen, M.: Cellular dynamics of bone
in: Bourne, G.H. (ed.)
The Biochemistry and Physiology of Bone
New York, Academic Press, Vol. III, 271-297 (1971)

Owen, M.: The origin of bone cells in the postfetal organism
Arthritis and Rheumatism 23, 1073-1080 (1980)

Pauwels, F.: Grundriß einer Biomechanik der Frakturheilung
Verh. dtsch. orthop. Ges. 34, 62-108 (1940)

Pritchard, J.J.: The osteoblast
in: Bourne. G.H. (ed.):
The Biochemistry and Physiology of Bone
first edition, New York, Academic Press
179-201 (1956)

Pritchard, J.J.: in: Bourne, G.H. (ed.):
The Biochemistry and Physiology of Bone
2 nd edition. New York, Academic Press
Vol. I, 1-45 (1976)

Putte, K.A. van de and Urist, M.R.: Osteogenesis in
the interior of intramuscular implants
of decalcified bone matrix
Clin. Orthop. 43, 257-270 (1965)

Raisz, L.G.; Canalis, E.M.; Dietrich, J.W.;Kream, B.E.
and Gworek, S.C.; Hormonal regulation of
bone formation
Recent Progress in Hormon Research
Vol. 34 Academic Press, New York - San-
Franzisko - London 335-356 (1978)

Rath, N.C. and Reddi, A.H.: Collagenous bone matrix
is a local mitogen
Nature (London) 278, 855-857 (1979)

Ray, R.D. and Holloway, A.: Bone implants. Preliminary
report of an experimental study
J. Bone Jt. Surg. 39-A, 119-1128 (1957)

Ray, R.D.; Degge, J.; Gloyd, P.and Mooney, G.: Bone
regeneration. An experimental study of
bone-grafting materials
J. Bone Jt. Surg. 34-A, 638-647 (1952)

Reddi, A.H.: Local and systemic mechanisms regulating
bone formation and remodelling: An overview
in: Silbermann, M.; Slavkin, H.C. (ed.):
Current advances in skeletogenesis
Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford - Prince-
town pp. 77-86 (1982)

Reddi, A.H. and Huggins, C.: Lactic-malic dehydrogenase
quotients during transformation of fibro-
blasts into cartalage and bone
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 127-129
(1971)

Reddi A.H. and Huggins, C.: Biochemical sequences in
the transformation of normal fibroblasts
in adolescent rats
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1601-1605
(1972)

Reddi, A.H. and Huggins, C.: Influence of geometrie of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 634-637 (1973)

Reddi, A. H. and Huggins, C.: Cyclic electrochemical inactivation and restoration of competence of bone matrix to transform fibroblats
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1648-1652 (1974)

Register, A.A.; Scopp, I.W.; Kassouny, D.Y.; Pfau, F.R. and Peskin, D.: Human bone induction by allogenic dentin matrix
J. Peridontal 43, 459 (1972)

Roux. W.: Gesammelte Abhandlungen Bd. I und II
Leipzig, Wilhelm Engelmann (1895)
Band II, S. 227

Sadjera, S.W. and Hascall, V.C.: Protein polysaccharide complex from bovine nasal cartilage. A comparison of low and high shear extractions procedure
J. Biol. Chem. 244, 77 (1968)

Sampath. T.K. and Reddi, A.H.: Dissoziative extraction and reconstruction of extracellular matrix components involved in local bone differentiation
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 7599-7603 (1981)

Schenk, R. und Willenegger, H.: Zur Histologie der primären Knochenheilung
Arch. klin. Chir. 308, 440-452 (1964)

Schüssler, H.: Über die chromatographische Auftrennung sowie Aktivierung und Inaktivierung der alkalischen Phosphatase aus Hühnerdarm
Biochem. Biophys. Acta 151, 383-393 (1968)

Senn, N.: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone
Am. J. Med. Sci. (new Series) 98, 219-243 (1889)

Shapiro, I.M.; Jones, S.J.; Hogg, N.M.; Slusarenko, M. and Boyde, A.: Use of SEM for the study of the sureface receptors of osteoclasts in situ
in: Scanning Electron Microscopy II, Chicago SEM Inc., AMF O'Hare, JL 60666, pp.539-545 (1979)

Shaw, J.L. and Bassett, C.A.L.: The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro
J. Bone Joint Surg. 49-A, 73-80 (1967)

Somerman, M.; Hewitt, T.; Warner, H.H.; Schiffmann, E.; Reddi, A.H. and Termine, J.D.: The role of chemotaxis in bone induction
in: Silbermann, M.; Slavkin, H.C. (eds.): Current advances in skeletogenesis
Excerpta Medica Amsterdam - Oxford - Princetown 1982

Spadaro, J.A.: Electrically stimulated bone growth in animal and man
Clin. Orthop. 122, 325-332 (1977)

Späth, G.: Vergleich der osteoinduktiven Wirkung allogener und xenogener Knochenmatriximplantate
Doktorarbeit, Tübingen 1979

Suzuki, F. and Kato, Y.: Cartilage-bone growth factor: somatomedin-like peptides isolated from fetal bovine cartilage
in: Silbermann, M.; Slavkin, H.C. (eds.): Current advances in skeletogenesis
Excerpta Medica Amsterdam - Oxford - Princetown 1982

Takaoka, K.; Ono, K.; Amitani, K.; Kishimoto, R. and Nakata, Y.: Solubilisation and concentration of bone-inducing substance from a murine osteosarcoma
Clin. Orthop. Rel. Res. 148, 274-280 (1980)

Tanfold, C.; Protein denaturation
Advan. Protein Chem. 23, 121 (1968)

Thielemann, F.W. (unveröffentlichte Befunde)

Thielemann, F.W.: Die Bedeutung der parakrinen Mechanismen der Knochenmatrix bei Regenerationsvorgängen des Knochengewebes
Habilitationsschrift, Universität Tübingen (1984)

Thielemann, F.W.; Schmidt, K. and Koslowski, L.: Osteoinduction, Part II: Purification of the osteoinductive activities of bone matrix
Arch. Orthop. Traumat. Surg. 100, 73-78 (1982)

Thorogood, P.V. and Gray, J.C.: The cellular changes during osteogenesis in bone and bone marrow composite autografts
J. Anat. 120, 27-47 (1975)

Urist, M.R.: Bone formation by autoinduction
Science 150, 893-899 (1965)

Urist, M.R.: The substratum for bone morphogenesis
Dev. Biol. 4, 125-163 (1970)

Urist, M.R.: Enzymes in bone morphogenesis: Endogenous enzymic degradation of the morphogenetic property in bone in solutions buffered by ethylene diamintetraacetic acid (EDTA)
Ciba Symp. 11, (new series), 143-160 (1973)

Urist, M.R. and Mc Lean, F.C.: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye
J.Bone Jt. Surg. 34-A, 443-476 (1952)

Urist, M.R. and Strates, B.S.: Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix
Clin. Orthop. 71, 271-278 (1970)

Urist, M.R. and Strates. B.S.: Bone morphogenetic protein
J. dent. Res. 50, 1392-1406 (1971)

Urist, M.R.; Silbermann, B.F.; Büring, K.; Dubuc, F.L. and Rosenberg, J.M.: The bone induction principle
Clin. Orthop. Rel. Res. 53, 243-283 (1967)

Urist, M.R.; Mikulski, A. and Boyd, S.D.: A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks
Arch. Surg. 110, 416-428 (1975)

Urist, M.R.; Iwata, H. and Strates, B.S.: Bone morphogenetic protein and protease in the guinea pig
Clin. Orthop. 85, 275-290 (1972)

Urist, M.R.; Mikulski, A. and Lietze, A.: Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1828-1832 (1979)

Urist, M.R.; Jurist, J.M.; Dubuc, F.L. and Strates, B.S.: Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits Clin. Orthop. 68, 279-293 (1970)

Urist, M.R.; Earnest, N.F.; Kimball, K.M.; Di Julio, T.P. and Iwata, H.: Bone morphogenesis in implants of residues of radioisotope labelled bone matrix Calc. Tiss. Res. 15, 269-286 (1974)

Urist, M.R.: Iwata, H.; Cecotti, P.L.; Dorfman, R.L.; Boyd, S.D.; Mc Dowell, R.M. and Chien, C.: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatine Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3511-3515 (1973)

Urist, M.R.; Nakata, N.; Felser, J.M.; Nogami, H.; Hanamura, H.; Miki, T. and Finerman, G.A.: An osteosarcoma cell and matrix retained morphogen for normal bone formation Clin. Orthop. 124, 251-266 (1977)

Urist, M.R.; De Lange, R.J. and Finerman, G.A.M.: Bone cell differentiation and growth factors Science 220, 680-686 (1983)

Vaes, G.: Lysosomes and the cellular physiology of bone resorption In: Dingle and Fell (eds.): Lysosomes in Biology and Pathology, Amsterdam-London, North Holland publ., Vol. 1, Chap. 8, pp. 217-253 (1969)

Vitalli, H.P.: Knochenerkrankungen, Histologie und Klinik Monographie, Sandoz 1970

Walter, K. und Schütt, L.: Alkalische Phosphatase im Serum In: Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse 2. Auflage, Weinheim 1970

Wickström, J. and Mosiman, R.: Observation of bone implants in the anterior chamber of the guinea-pig eye Scientific Exhibit, The Americ. Acad. of Orthop. Surgeons, Chicago III, 1951

Wientroub, S. and Reddi, A.H.: Vitamin D metabolites and enchondral bone development in: Silbermann, M. and Slavkin, H.C.(eds): Current advances in skeletogenesis Excerpta Medica. Amsterdam - Oxford - Princetown 1982

Willmer, E.N.: Cytology and Evolution 2 nd ed. Academic Press, New York, 1970

Wjereschinski, A.: Beiträge zur Frage über das Schicksal der Knochentransplantate Arch. f. Klin. Chir. 136, 545-567 (1925)

Wlodarski, K.; Poltorak, A. and Koziorowska, J.: Species specifity of osteogenesis induced by wish cell line and bone induction by vaccinia virus transformed human fibroblasts Calc. Tiss. Res. 7, 345-352 (1971)

Wlodarski, K.; Ptasinska-Urbanska, M.; Moskalewski, S. and Jedrasiewics, B.: Comparison of the efficiency of bone induction by decalcified bone matrix in the mouse and rabbit Fol. Biol. 22, 377-383 (1974)

Young, R.W.: Cell proliferation and specialization during enchondral osteogenesis in young rats J. Cell Biol. 14, 357-370 (1962)

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Sibylle Emhart, geb. Beck
Geburtsdatum:	31. August 1959
Geburtsort:	Mengen (Kreis Sigmaringen)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Bekenntnis:	römisch-katholisch
Familienstand:	verheiratet seit dem 29. April 1983 Ehemann: Bernd Emhart, Diplom-Ingenieur

Schulbildung:

April 1965 bis Juli 1969	Grundschule Mengen
September 1969 bis Mai 1978	Liebfrauenschule Sigmaringen (staatlich anerkanntes neusprachliches Mädchengymnasium)

Studium:

Oktober 1978 bis April 1965	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
	Praktisches Jahr: Städtisches Krankenhaus, Esslingen
	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 18. April 1985